



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**EFEITO CITOTÓXICO DE DUAS RESINAS UTILIZADAS EM
PRÓTESE REMOVÍVEL: PROBASE® HOT VS PROBASE® COLD
– UM ESTUDO *IN VITRO***

Trabalho submetido por
Diogo Alexandre Moreira Arruda
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**EFEITO CITOTÓXICO DE DUAS RESINAS UTILIZADAS EM
PRÓTESE REMOVÍVEL: PROBASE® HOT VS PROBASE® COLD
– UM ESTUDO *IN VITRO***

Trabalho submetido por
Diogo Alexandre Moreira Arruda
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Isabel Barahona

e coorientado por
Prof. Doutor Sérgio Félix / Mestre Joana Carvalho

outubro de 2018

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Doutora Isabel Barahona, pelo apoio, disponibilidade e tempo dispensado ao longo desta última fase do meu percurso académico.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor Sérgio Félix, por todo o auxílio e por me ter permitido participar no Departamento de Reabilitação Oral, onde pude expandir o meu conhecimento e gosto pela área.

À minha coorientadora, Mestre Joana Carvalho, professora que me acompanhou muito ao longo dos últimos três anos. Muito obrigado pela ajuda incansável, dedicação e ininterrupta disponibilidade.

À Professora Susana Bandarra, pela disponibilidade, dedicação e apoio indispensáveis para a realização desta investigação e por me ter ensinado tudo aquilo que precisava sobre a cultura de células em laboratório.

A todo o Departamento de Biologia Celular e Molecular, por terem estado sempre disponíveis para ajudar.

Ao Prof. Doutor Luís Proença, por ter dispensado o seu tempo para ajudar na análise estatística e interpretação dos resultados desta investigação.

A todos os outros Professores e Funcionários que me acolheram ao longo destes cinco anos e que tornaram muito agradável a minha passagem pelo Instituto.

Aos meus pais, aos meus avós e ao meu irmão, por estarem sempre presentes na minha vida, disponibilizando sempre todos os recursos, educação e apoio necessários para que esta conquista fosse possível. Obrigado por terem sempre acreditado em mim.

À Marta Cádima, namorada e amiga, por estar ao meu lado desde a minha infância, nos bons e maus momentos, sempre com grande preocupação, carinho e dedicação. Por todo o apoio e incentivos que me deu ao longo da vida, por me ter ensinado a nunca desistir e por todas as boas memórias que criámos juntos.

À Lúcia Malta, colega de box e amiga, por ter estado sempre do meu lado, desde o primeiro ao último dia de clínica, e pela excelente equipa que formámos.

À Teresa Gomes por tornar os dias de clínica mais divertidos.

Ao Pedro Valério, Pedro Gomes e Diogo Desidério, amigos que sempre estiveram presentes ao longo da minha vida.

RESUMO

Introdução: As resinas de polimetilmetacrilato são materiais essenciais no campo da Reabilitação Oral. No entanto, o seu uso tem sido posto em causa, uma vez que podem originar reações adversas nos tecidos adjacentes. Trabalhos anteriores mostraram que as resinas autopolimerizáveis libertam maiores quantidades de monómeros residuais, quando comparadas com as termopolimerizáveis. Assim, torna-se importante perceber se os métodos de polimerização têm influência na citotoxicidade desses materiais.

Objetivos: Avaliar, *in vitro*, o nível de citotoxicidade das resinas ProBase® Hot e ProBase® Cold em fibroblastos 3T3, com a hipótese de que existem diferenças entre as resinas acrílicas ProBase®, no que diz respeito à sua citotoxicidade.

Materiais e Métodos: Os espécimes foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, 4 discos (5mm x 2mm) foram incubados por 30 minutos, 24 horas, 7 dias, 14 dias e 1 mês em 7mL de meio de cultura. Diluições em série dos extratos de resina previamente incubados foram colocados em contacto com 4×10^3 e 2×10^4 fibroblastos de murganho 3T3, plaqueados no dia anterior numa placa de 96 poços. Após 24 horas de exposição, a viabilidade celular foi avaliada através dos ensaios do Cristal Violeta e do MTT. A absorvância foi lida a 595nm no leitor de microplacas Bio-Rad 680. Foi utilizado o ANOVA Factorial (SPSS, Chicago, IL) para análise estatística dos resultados, aceitando-se uma significância de 5%.

Resultados: Todos os fatores testados (resinas, diluições e tempo) produziram diferenças significativas na viabilidade celular. Houve diferenças estatisticamente significativas entre ambas as resinas, embora pouco significativas em termos experimentais e clínicos. A viabilidade celular nunca foi inferior a 70%, sendo este o limite estabelecido na norma ISO 10993-5:2009 para um material ser considerado citotóxico.

Conclusão: Nas condições testadas, as resinas ProBase® não são citotóxicas. Existem algumas diferenças de citotoxicidade, sugerindo que o método de polimerização tem influência.

Palavras-Chave: Resinas Acrílicas, Citotoxicidade, Monómeros Residuais, Prótese Removível

ABSTRACT

Introduction: Polymethylmethacrylate resins are essential materials in the Oral Rehabilitation field. However, their use is being called into question once they can cause adverse reactions in the adjacent tissues. Previous works have shown that auto-polymerized resins release higher amounts of residual monomers than heat-polymerized resins. Having that in consideration, it is important to know if polymerization methods have influence in the cytotoxicity of these materials.

Objectives: In this *in vitro* study, our aim is to evaluate the cytotoxicity level of ProBase® Hot and ProBase® Cold in fibroblastic cell line using cell viability assays and our hypothesis is that there are differences between ProBase® acrylic resins, regarding their cytotoxicity.

Materials and Methods: Specimens of each resin were prepared according to manufacturer's instructions. Then, 4 disks (5mm x 2mm) were immersed in 7mL of culture medium and incubated for 30 minutes, 24 hours, 7 days, 14 days and 1 month. Serial dilutions of the previously incubated resin extracts were placed in contact with 4×10^3 and 2×10^4 of 3T3 mouse fibroblasts plated in a 96 well plate the day before. After 24 hours of exposition, cell viability was evaluated through the Crystal Violet and the MTT assays. Absorbance was measured at 595nm in a microplate reader (Bio-Rad 680). The results were evaluated by Factorial ANOVA (SPSS, Chicago, IL) and the level of significance was chosen as p-value < 0.05.

Results: All tested factors (resins, dilutions and time) have shown to produce significant differences in cell viability. There were statistically significant differences between both resins but not significant in experimental and clinical terms. Cell viability was never below 70%, which is the threshold stated in ISO 10993-5:2009 to be considered cytotoxic.

Conclusion: Our results show that ProBase® resins are not cytotoxic in our cell model and that there were some differences in cytotoxicity, suggesting that the polymerization method has influence.

Keywords: Acrylic Resins, Cytotoxicity, Residual Monomers, Removable Denture

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	15
1. Reabilitação Oral.....	15
1.1 Edentulismo.....	15
1.1.1. Classificações de Edentulismo Parcial	16
1.2. Reabilitação Protética	18
1.2.1. Prótese Removível.....	18
1.2.1.1. Tipos de Próteses Removíveis.....	19
1.2.1.2. Indicações e Contraindicações das Próteses Removíveis.....	20
2. Biomateriais	21
2.1. Biomateriais Poliméricos	21
2.2. Resinas Acrílicas	23
2.2.1. Composição das Resinas Acrílicas	23
2.2.2. Reação de Polimerização das Resinas Acrílicas.....	24
2.2.3. Tipos de Polimerização das Resinas Acrílicas	26
2.2.3.1. Polimerização térmica	27
2.2.3.2. Polimerização química	28
2.2.4. Monômero residual.....	28
2.2.5. Reações Adversas	29
3. Testes de Biocompatibilidade	30
3.1. Teste de Redução do MTT	31
3.2. Teste de Cristal Violeta	32
4. Linha Celular	33
II. OBJETIVOS E HIPÓTESE EM ESTUDO	35
1. Objetivos.....	35
2. Hipótese em Estudo	35
III. MATERIAIS E MÉTODOS	37
1. Materiais.....	37
1.1. Resinas	37

1.2. Linha Celular	37
1.3. Reagentes.....	38
1.4. Equipamentos de laboratório de cultura de células	39
2. Métodos	40
2.1. Preparação dos extratos das resinas	40
2.2. Cultura de células	41
2.2.1. Subculturas	41
2.2.2. Subculturas em placas de 96 poços	42
2.3. Determinação da viabilidade celular	43
2.3.1. Teste de Redução do MTT	43
2.3.2. Teste do Cristal Violeta	45
A. Ensaio I: OTIMIZAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS	46
B. Ensaio II: ESCOLHA DO CONTROLO DE MORTE CELULAR.....	47
C. Ensaio III: EXTRATOS DE RESINAS ACRÍLICAS EM CONTACTO COM 4×10^3 CÉLULAS – TESTE DO CRISTAL VIOLETA	48
D. Ensaio IV: EXTRATOS DE RESINAS ACRÍLICAS EM CONTACTO COM 2×10^4 CÉLULAS – TESTE DE REDUÇÃO DO MTT	49
3. Análise Estatística.....	51
IV. RESULTADOS	53
A. Ensaio I: OTIMIZAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS.....	53
1. Teste do Cristal Violeta:	53
2. Teste de redução do MTT:.....	54
B. Ensaio II: ESCOLHA DO CONTROLO DE MORTE CELULAR.....	55
C. Ensaio III: EXTRATOS DE RESINAS ACRÍLICAS EM CONTACTO COM 4×10^3 CÉLULAS – TESTE DO CRISTAL VIOLETA	56
1. 30 minutos:	56
2. 24 horas:	58
3. 7 dias:.....	60
4. 14 dias:.....	62
D. Ensaio IV: EXTRATOS DE RESINAS ACRÍLICAS EM CONTACTO COM 2×10^4 CÉLULAS – TESTE DE REDUÇÃO DO MTT	65
1. 30 minutos:	65
2. 24 horas:	67

3.	7 dias:.....	69
4.	14 dias:.....	71
5.	1 mês:.....	73
V.	DISCUSSÃO	77
VI.	CONCLUSÃO.....	83
VII.	BIBLIOGRAFIA	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Edentulismo parcial (http://www.blendedentalgroup.com/professionals/case-studies/mary-jane/).	15
Figura 2. Edentulismo total (Altarawneh, Limmer, Reside, & Cooper, 2015).	15
Figura 3. Classificação de Kennedy (adaptada de Carr & Brown, 2011).	17
Figura 4. Próteses totais (Adaptado de https://www.beckettridgechiro.com/albums/Partial%20Dentures/denture-partial-dentures-braces-for-children's-teeth-dental-augmentation-advantages-nylon-and-problems-flexible-front-or-chaska-partialdentures-dentist-center-smile-restorative-model-with-pl.jpg).	19
Figura 5. Próteses parciais removíveis (Adaptado de https://www.beckettridgechiro.com/albums/Partial%20Dentures/denture-partial-dentures-braces-for-children's-teeth-dental-augmentation-advantages-nylon-and-problems-flexible-front-or-chaska-partialdentures-dentist-center-smile-restorative-model-with-pl.jpg).	20
Figura 6. Prótese em marfim (http://broughttolife.sciencemuseum.org.uk/hommedia.ashx?id=11315&size=Large).	22
Figura 7. Prótese em osso. (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3f/Lower_denture_with_human_teeth%2C_England%2C_1800-1870_Wellcome_L0057248.jpg).	22
Figura 8. Fórmulas estruturais do Monômero MMA e do Polímero PMMA (Ali et al., 2015).	22
Figura 9. Reação de polimerização por adição; R* - espécie reativa; M – monômero (McCabe & Walls, 2008).	25
Figura 10. Redução do MTT (A) a formazan (B) (Sittampalam et al., 2018).	31
Figura 11. Esquema simplificado do ensaio do Cristal Violeta (adaptado de Feoktistova et al., 2016).	32
Figura 12. Células NIH/3T3 observadas ao microscópio ótico.	38
Figura 13. Falcons com 7ml de meio e 4 discos de resina.	40
Figura 14. Frasco de cultura T25, após passagem para nova subcultura.	42

Figura 15. Placa de 96 poços cultivada com 4×10^3 de células e 200µl de meio de cultura em cada poço.	43
Figura 16. Placa de 96 poços utilizada na otimização do número de células para o ensaio do Cristal Violeta.....	46
Figura 17. Placa de 96 poços utilizada na escolha do controlo de morte celular.	47
Figura 18. Esquema representativo do fluxo de trabalho seguido nos ensaios III e IV.	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificações das resinas acrílicas com base no seu método de polimerização (adaptada de McCabe & Walls, 2008).	26
Tabela 2. Reagentes utilizados ao longo da investigação.	38
Tabela 3. Equipamentos laboratoriais utilizados ao longo da investigação.	39
Tabela 4. Valores médios de absorvância (595nm) e respetivo desvio padrão referentes a cada um dos números de células usados e obtidos através do teste do Cristal Violeta.	53
Tabela 5. Valores médios de absorvância (595nm) e respetivo desvio padrão referentes a cada um dos números de células usados e obtidos através do teste de redução do MTT.	54
Tabela 6. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão referentes a cada um dos compostos utilizados.	55
Tabela 7. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 30 minutos (Ensaio III).	57
Tabela 8. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio III – 30 minutos).	58
Tabela 9. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 24 horas (Ensaio III).	59
Tabela 10. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio III – 24 horas).	60
Tabela 11. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 7 dias (Ensaio III).	60
Tabela 12. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio III – 7 dias).	61
Tabela 13. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 14 dias (Ensaio III).	62

Tabela 14. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio III – 14 dias).	63
Tabela 15. Testes de avaliação de fatores e sua interação, de acordo com os resultados obtidos no Ensaio III.	64
Tabela 16. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 30 minutos (Ensaio IV).....	65
Tabela 17. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio IV – 30 minutos).....	66
Tabela 18. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 24 horas (Ensaio IV).....	67
Tabela 19. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio IV – 24 horas).	68
Tabela 20. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 7 dias (Ensaio IV).	69
Tabela 21. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio IV – 7 dias).	70
Tabela 22. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 14 dias (Ensaio IV).....	71
Tabela 23. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio IV – 14 dias).	72
Tabela 24. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 1 mês (Ensaio IV).	73
Tabela 25. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio IV – 1 mês).	74
Tabela 26. Testes de avaliação de fatores e sua interação, de acordo com os resultados obtidos no Ensaio IV.	75

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Valores médios de absorvância (595nm) \pm desvio padrão referentes a cada um dos números de células usados e obtidos através do teste do Cristal Violeta.	53
Gráfico 2. Valores médios de absorvância (595nm) \pm desvio padrão referentes a cada um dos números de células usados e obtidos através do teste de redução do MTT.	54
Gráfico 3. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão referentes a cada um dos compostos utilizados.	55
Gráfico 4. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 30 minutos (Ensaio III). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.	57
Gráfico 5. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 24 horas (Ensaio III). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.	59
Gráfico 6. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 7 dias (Ensaio III). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.	61
Gráfico 7. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 14 dias (Ensaio III). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.	63
Gráfico 8. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 30 minutos (Ensaio IV). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.	66
Gráfico 9. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 24 horas (Ensaio IV). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.	68

Gráfico 10. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 7 dias (Ensaio IV). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.	70
Gráfico 11. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 14 dias (Ensaio IV). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.	72
Gráfico 12. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 1 mês (Ensaio IV). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.	74
Gráfico 13. Viabilidade Celular dos fibroblastos 3T3 quando expostos aos extratos não diluídos das resinas ProBase® e recorrendo ao teste do Cristal Violeta.....	76
Gráfico 14. Viabilidade Celular dos fibroblastos 3T3 quando expostos aos extratos não diluídos das resinas ProBase® e recorrendo ao teste do MTT.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido Desoxirribonucleico (**ADN**)

Articulação Temperomandibular (**ATM**)

Bisfenol-glicidilmetacrilato (**bis-GMA**)

Bovine Calf Serum (**BCS**)

Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (**MTT**)

Dimetacrilato de etilenoglicol (**EGDMA**)

Dimetilsulfóxido (**DMSO**)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (**DMEM**)

International Organization for Standardization (**ISO**)

Metilmetacrilato (**MMA**)

Ordem dos Médicos Dentistas (**OMD**)

Phosphate Buffered Saline (**PBS**)

Polimetilmetacrilato (**PMMA**)

Prótese Parcial Removível (**PPR**)

Solução de penicilina-streptomicina (**Pen/Strep**)

Solução de piruvato de sódio (**PNA**)

Statistical Package for the Social Sciences (**SPSS**)

Uretano-dimetilmetacrilato (**UDMA**)

% - Percentagem

rpm – Rotações por minuto

µl – Microlitros

mL – Mililitros

I. INTRODUÇÃO

1. Reabilitação Oral

1.1 Edentulismo

A ausência de peças dentárias é denominada de edentulismo e esta condição decorre vulgarmente de patologias tais como a cárie dentária e a doença periodontal, sendo que estas duas são as mais comuns. No entanto, o tratamento ortodôntico, os traumas, as lesões quísticas e neoplásicas, os dentes supranumerários e os dentes impactados estão também entre os fatores que podem levar à perda de peças dentárias (Abdel-Rahman, Tahir, & Saleh, 2013; Jeyapalan & Krishnan, 2015).

O edentulismo parcial (Figura 1.) decorre quando estamos na presença de uma arcada dentária onde falta um ou mais dentes naturais, já no edentulismo total (Figura 2.) temos a ausência de todos os dentes de uma ou de ambas as arcadas dentárias da cavidade oral (Jeyapalan & Krishnan, 2015).



Figura 1. Edentulismo parcial
(<http://www.blendedentalgroup.com/professionals/case-studies/mary-jane/>).



Figura 2. Edentulismo total (Altarawneh, Limmer, Reside, & Cooper, 2015).

Relativamente a Portugal, segundo o Barómetro da Saúde Oral de 2017, apenas 32,4% da população inquirida conserva todos os dentes naturais (com exceção dos terceiros molares). Dos restantes, 37,8% tem falta de um a cinco dentes, 10,8% tem falta

de seis a oito dentes, 12,9% tem mais de oito dentes ausentes e 6,2% não tem nenhum dente natural, perfazendo um total de 67,7% de edentulismo (OMD, 2017).

O Barómetro da Saúde Oral indica-nos ainda que 35,8% dos portugueses com falta de dentes naturais são portadores de prótese dentária e que 6,7% possuem dentes fixos. No entanto, mais de metade (57,4%) desses portugueses não tem nada a substituir os seus dentes perdidos (OMD, 2017).

1.1.1. Classificações de Edentulismo Parcial

No caso dos desdentados parciais, são inúmeras as combinações possíveis, calculando-se que sejam possíveis mais de 65000 combinações entre espaços desdentados e dentes remanescentes (Al-Johany & Andres, 2008). Neste sentido, foi necessário criar um sistema de classificação para auxiliar na comunicação entre profissionais de saúde oral e na discussão do plano de tratamento a seguir, tornando mais fácil a visualização imediata da arcada dentária (Galagali & Mahoorkar, 2010).

Segundo Carr & Brown (2011), um sistema de classificação de arcadas parcialmente desdentadas deve permitir uma rápida visualização da arcada em questão, permitir a distinção entre prótese parcial removível dento-suportada ou dento-muco-suportada e deve ser universalmente aceite.

O primeiro sistema aceite foi o de Cummer, no ano de 1920, cuja classificação tinha por base o número de retentores diretos e respetiva posição, bem como a posição dos retentores indiretos. A grande desvantagem deste sistema é o facto de não ter em conta as zonas desdentadas (Galagali & Mahoorkar, 2010).

Três anos depois, em 1923, o Dr. Edward Kennedy, apresentou um sistema de classificação baseado na relação entre os dentes pilares e os espaços desdentados, sendo este o método atualmente mais utilizado em todo o mundo. Neste sistema existem, então, quatro possíveis categorias (Figura 3.): a Classe I, referente às arcadas dentárias com zonas desdentadas bilaterais, posteriores aos dentes remanescentes; a Classe II, igual à anterior, mas referente apenas a situações unilaterais; a Classe III, na qual encontramos uma zona desdentada, limitada por dentes remanescentes em anterior e posterior; e, por último, a Classe IV, onde se verifica uma zona desdentada simétrica (tendo em conta a

linha média) localizada na região anterior da arcada dentária (Al-Johany & Andres, 2008; Galagali & Mahoorkar, 2010).

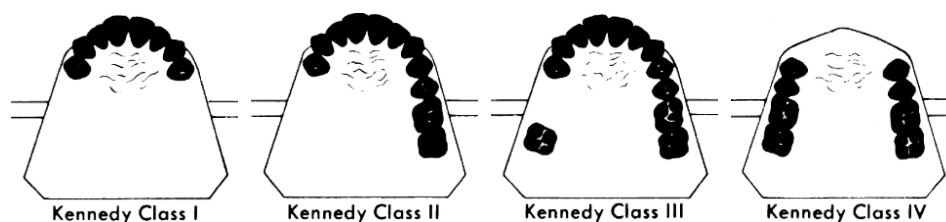


Figura 3. Classificação de Kennedy (adaptada de Carr & Brown, 2011).

Em 1954, Applegate definiu oito regras para a classificação de Kennedy, uma vez que seria difícil aplicar a mesma a todas as situações sem a existência de normas para nos guiarmos (Al-Johany & Andres, 2008; Carr & Brown, 2011). As oito regras que vieram, então, dar origem à classificação de Applegate-Kennedy, são as seguintes (Carr & Brown, 2011):

1. A classificação deve ser aplicada após qualquer extração dentária que venha a afetar a classificação inicial.
2. Na ausência de um terceiro molar e, apenas quando não se prevê substituição do mesmo, este não é tido em conta para a classificação.
3. Na presença de um terceiro molar que vá ser usado como dente pilar, este é considerado para a classificação.
4. Na ausência de um segundo molar e, apenas quando não se prevê substituição do mesmo, este não é tido em conta para a classificação.
5. As zonas desdentadas mais posteriores são sempre as que definem a classificação.
6. As restantes zonas desdentadas, para além daquela que definiu a classificação, são tidas como modificações.
7. Para as modificações referidas anteriormente conta apenas o número das mesmas e não a sua extensão.
8. As Classes IV não contemplam modificações.

Nos anos seguintes, novas classificações continuaram a surgir, nomeadamente as Classificações de Bailyn (1928), de Neurohr (1939), de Mauk (1941), de Wild (1949), de Godfrey (1951), de Friedman (1953), de Beckett (1953), de Craddock (1954), de Austin-Lidge (1957), entre outras. No entanto, a Classificação de Kennedy nunca deixou de ser a mais consensual, sendo por isso a mais utilizada em todo o mundo (Carr & Brown, 2011; Galagali & Mahoorkar, 2010).

1.2. Reabilitação Protética

O edentulismo influencia negativamente a função oral destes doentes, uma vez que as suas capacidades de comer e falar ficam diminuídas, e acaba por afetar também a vida social e as atividades do dia-a-dia. Uma vez que a estética fica comprometida, são muitos os doentes que se deparam com graves problemas de autoestima e que acabam por reduzir a sua participação na vida social, acabando alguns por se isolarem (Emami, Souza, Kabawat, & Feine, 2013).

Torna-se, então, imperativa a reabilitação oral destes doentes.

1.2.1. Prótese Removível

De acordo com o *Glossary of Prosthodontic Terms* da *Academy of Prosthodontics*, podemos definir uma prótese como um substituo artificial dos dentes naturais perdidos e respetivo tecido adjacente e podemos definir prótese removível como aquelas que podem ser prontamente removidas da cavidade oral pelo doente.

1.2.1.1. Tipos de Próteses Removíveis

Dentro das próteses removíveis, e dependendo do tipo de edentulismo, podemos reabilitar os doentes com próteses totais ou próteses parciais (Assaoka, Cesar, & Oliveira, 2012).

Uma prótese total (Figura 4.) vai, então, ser utilizada quando estamos perante um caso de edentulismo total. Estes casos apresentam-se como um dos maiores desafios para a Medicina Dentária, uma vez que todo o sistema estomatognático está afetado, nomeadamente ao nível muscular, dimensão vertical, estética e função. Assim, as próteses totais substituem não alguns, mas sim todos os dentes de uma arcada dentária e devolvem ao doente a estética, função, fonética e, em última análise, a autoestima (Assaoka et al., 2012; Volpato, Garbelotto, Zani, & Vasconcellos, 2012).



Figura 4. Próteses totais (Adaptado de <https://www.beckettridgechiro.com/albums/Partial%20Dentures/denture-partial-dentures-braces-for-children's-teeth-dental-augmentation-advantages-nylon-and-problems-flexible-front-or-chaska-partialdentures-dentist-center-smile-restorative-model-with-pl.jpg>).

A prótese parcial removível (PPR) (Figura 5.), por outro lado, é utilizada em casos de edentulismo parcial, quando existe uma extensão considerável de espaço protético e na ausência de dentes posteriores a esse espaço. Vai, portanto, substituir um ou mais dentes de uma arcada dentária, mas não todos. É uma prótese que também pretende restabelecer a função mastigatória, a estética, a fonética e preservar os dentes remanescentes e respetivo periodonto, sem danificar os elementos biológicos com os quais contacta (Assaoka et al., 2012; Fiori, 1993).



Figura 5. Próteses parciais removíveis (Adaptado de <https://www.beckettridgechiro.com/albums/Partial%20Dentures/denture-partial-dentures-braces-for-children's-teeth-dental-augmentation-advantages-nylon-and-problems-flexible-front-or-chaska-partialdentures-dentist-center-smile-restorative-model-with-pl.jpg>).

1.2.1.2. Indicações e Contraindicações das Próteses Removíveis

Genericamente, e para ambos os tipos de próteses removíveis, é importante ter em conta as condições biológicas orais presentes, as condições financeiras do doente, a formação profissional do médico-dentista na área para decidir se é indicada a utilização de Próteses Removíveis. No caso das PPR, existe indicação quando o espaço protético possui uma extensão considerável, quando são vários os espaços protéticos, quando não há indicação para prótese fixa, quando queremos a substituição imediata de dentes perdidos/extraídos e quando pretendemos uma solução temporária e/ou que sirva de guia para uma reabilitação mais complexa (Fiori, 1993; Volpato et al., 2012).

Mais especificamente, temos de ter em conta fatores como a condição, o número e a distribuição dos dentes pilares, a incidência de cárie dentária, a mobilidade dos dentes naturais existentes, bem como a condição do osso e do periodonto, a saúde geral e a da articulação temporomandibular (ATM) do doente (Fiori, 1993).

Relativamente às contraindicações, as próteses removíveis não devem ser usadas por pessoas com problemas motores, já que estes não as vão conseguir inserir e retirar corretamente, assim como não vão conseguir efetuar a correta higienização das mesmas. Do mesmo modo, não devem ser usadas por aqueles que possuem hábitos de higiene desapropriados, uma vez que o aparecimento e/ou agravamento de doenças periodontais e lesões de cárie será muito provável, diminuindo o tempo de vida da reabilitação protética (Volpato et al., 2012).

Após uma reabilitação protética, é expectável que a prótese removível seja utilizada grande parte do dia, tirando apenas para higienizar e durante o sono. Deste modo, a resina acrílica presente nas próteses irá ter longos períodos de contacto com os tecidos orais, motivo pelo qual se torna importante abordar a temática dos biomateriais.

2. Biomateriais

De acordo com o *Glossary of Prosthodontic Terms* da *Academy of Prosthodontics*, podemos definir um biomaterial como qualquer substância, que não sendo um fármaco, pode ser utilizada, independentemente do período de tempo, como parte de um sistema, no qual o seu objetivo é tratar, aumentar ou substituir um tecido, órgão ou função do corpo em que se insere.

2.1. Biomateriais Poliméricos

Na ocorrência de várias reações químicas, são vários os monómeros (moléculas de baixo peso molecular) que se ligam entre si, dando origem a grandes macromoléculas chamadas polímeros (de cadeia longa e alto peso molecular) (Anusavice, Shen, & Rawls, 2013).

Antes do século XVIII, o marfim, o osso e a madeira eram alguns dos materiais usados na confecção de próteses dentárias. Mais tarde, com a introdução da borracha natural na medicina dentária, iniciou-se uma nova era - a do uso dos polímeros em prótese removível. Em 1853 foi introduzida a borracha vulcanizada na confecção das bases protéticas, e posteriormente a celulose para reproduzir os tecidos adjacentes aos dentes, entre outros materiais. No entanto, todos eles foram mostrando que possuíam grandes limitações, nomeadamente em termos estéticos e funcionais (Anusavice, Shen, & Rawls, 2013; Francis, Shetty, Shenoy, & Somaraj, 2016; Huebsch & Mooney, 2009).



Figura 6. Prótese em marfim
(<http://broughttolife.sciencemuseum.org.uk/hommedia.ashx?id=11315&size=Large>).



Figura 7. Prótese em osso.
(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3f/Lower_denture_with_human_teeth%2C_England%2C_1800-1870_Wellcome_L0057248.jpg).

Em 1936 foi introduzido um novo material, o polimetilmetacrilato (PMMA), o qual polimeriza com o calor. Cerca de quatro anos depois, este material já era utilizado em próteses, coroas e inlays. Simultaneamente é introduzido o PMMA autopolimerizável - polimerizado à temperatura ambiente – o que permitiu o aparecimento de materiais restauradores diretos (Anusavice et al., 2013).

O PMMA é um polímero sintético, derivado do monómero de metilmetacrilato (MMA) (Figura 8.) (Ali, Karim, & Buang, 2015).

No final dos anos 50, as resinas de PMMA deram lugar às resinas compostas, melhores em termos de duração, que contêm bisfenol-glicidilmetacrilato (bis-GMA) e uretano-dimetilmetacrilato (UDMA) (Anusavice et al., 2013).

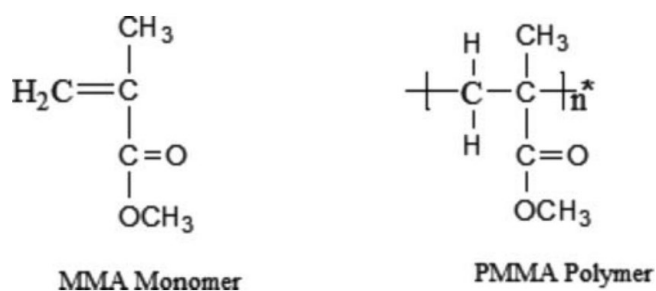


Figura 8. Fórmulas estruturais do Monómero MMA e do Polímero PMMA (Ali et al., 2015).

2.2. Resinas Acrílicas

As resinas acrílicas derivadas de PMMA são usadas nas mais diversas áreas da Medicina Dentária (Goiato, Freitas, Dos Santos, De Medeiros, & Sonego, 2015). Estas resinas, classificadas como polímeros de produção sintética, apresentam uma grande variabilidade de aplicações devido à sua estabilidade funcional, biocompatibilidade, manuseamento fácil, estética aceitável e propriedades térmicas, físicas e mecânicas satisfatórias (Camacho, Svidzinski, Furlaneto, Lopes, & Corrêa, 2014).

De acordo com Carr & Brown (2011), os requisitos que um material deve possuir para poder ser usado nas bases das próteses removíveis são:

- ✓ Boa adaptação aos tecidos, com poucas diferenças em termos de volume;
- ✓ Superfície capaz de manter um bom acabamento, densa e não irritante;
- ✓ Condutividade térmica;
- ✓ Baixo peso;
- ✓ Facilmente higienizável;
- ✓ Boa estética;
- ✓ Facilidade em realizar ajustes futuros;
- ✓ Baixo custo.

2.2.1. Composição das Resinas Acrílicas

As resinas acrílicas são disponibilizadas na forma de pó e líquido. O pó contém, então, o polímero, sendo composto por pequenas esferas de PMMA pré-polimerizado e por peróxido de benzoílo, o qual tem um papel fundamental na reação de polimerização por funcionar como iniciador da mesma. Possui também pigmentos na forma de sais de ferro ou cádmio. O líquido possui, por sua vez, o monômero, sendo composto por metilmetacrilato e hidroquinona, a qual vai servir de inibidora de uma possível

polimerização durante o armazenamento e vai também fazer com que o processo de polimerização seja mais demorado, representando assim uma vantagem no que diz respeito ao tempo de trabalho. Possui também dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA), um agente de ligação cruzada (Anusavice et al., 2013; Camacho et al., 2014; McCabe & Walls, 2008).

Usualmente é indicada uma proporção polímero-monómero de 3:1. Quando ambos são misturados nas proporções certas, é formada uma massa que vai obtendo particularidades características de cinco fases diferentes, também conhecidas como “fases da mistura” (Anusavice et al., 2013; Camacho et al., 2014):

1. Na primeira fase, semelhante a “areia molhada” e chamada de fase arenosa, é escassa a interação molecular (Anusavice et al., 2013);
2. De seguida, quando a solução com os monómeros (líquido) dissolve o polímero (pó), origina-se uma massa com textura viscosa, caracterizada pela formação de fios durante a sua manipulação, motivo pelo qual esta fase se denomina de “pegajosa” (Camacho et al., 2014);
3. Na fase plástica, a mistura atinge as condições ideais para ser manipulada, razão pela qual esta fase é vulgarmente conhecida como fase de trabalho (Anusavice et al., 2013; Camacho et al., 2014);
4. Na fase borrachóide ocorre a evaporação dos monómeros residuais, levando ao aparecimento de características típicas da borracha como, por exemplo, propriedades elásticas (Anusavice et al., 2013);
5. Por último, na fase rígida, após a evaporação dos monómeros se prolongar, a mistura seca e acaba por endurecer. Nesta fase deixa de ser possível deformar o material mecanicamente (Anusavice et al., 2013).

2.2.2. Reação de Polimerização das Resinas Acrílicas

A reação de polimerização (processo de transformação de monómeros em polímeros) dá-se, então, quando o líquido é adicionado ao pó, dissolvendo-o e originando uma massa plástica. Este processo pode ser ativado de forma química ou através do calor ou da luz (McCabe & Walls, 2008; Powers & Wataha, 2008).

A polimerização pode dar-se por reações de adição ou por reações de condensação. As resinas acrílicas polimerizam por adição (Figura 9.) (Anusavice et al., 2013; McCabe & Walls, 2008).

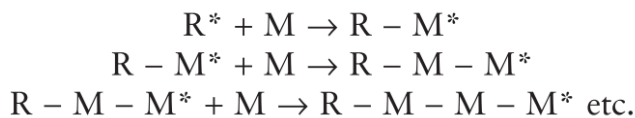


Figura 9. Reação de polimerização por adição; R* - espécie reativa;
M – monómero (McCabe & Walls, 2008).

Uma reação de adição consiste basicamente em juntar duas moléculas de forma a originar uma terceira molécula, maior. Nestas reações são adicionadas espécies reativas aos monómeros, de forma a originar uma espécie reativa maior e também capaz de se ligar a outros monómeros. Estas espécies reativas podem ser compostos iónicos ou radicais livres, sendo estes últimos os mais usados no caso dos polímeros dentários (McCabe & Walls, 2008).

As reações de polimerização por adição podem dividir-se em quatro fases: ativação, iniciação, propagação e terminação (McCabe & Walls, 2008).

1. Ativação: consiste na decomposição do peróxido de benzoílo (iniciador) através de ativação química ou com recurso a calor ou radiação, formando um ou dois radicais livres (Camacho et al., 2014; McCabe & Walls, 2008).
2. Iniciação: quando o radical, originado na ativação, reage com o monómero, inicia-se a reação de polimerização, originando-se novas e maiores espécies reativas (Camacho et al., 2014; McCabe & Walls, 2008).
3. Propagação: os novos radicais livres, formados na iniciação, continuam a reagir com monómeros. Cada reação dá origem a uma nova espécie reativa cada vez maior, a qual reage novamente com monómeros e assim sucessivamente. Neste processo, a cadeia vai crescendo em tamanho e peso molecular. Teoricamente, estas reações em cadeia continuam até que todos os monómeros tenham sido transformados em polímero (Anusavice et al., 2013; Camacho et al., 2014; McCabe & Walls, 2008).
4. Terminação: nesta fase dão-se reações idênticas às que ocorrem na propagação. No entanto, originam cadeias de polímeros mortas que não

estão aptas a juntar-se novamente com monómeros. A terminação pode também ocorrer quando uma cadeia em crescimento se junta a solventes, impurezas ou moléculas da iniciação (McCabe & Walls, 2008).

2.2.3. Tipos de Polimerização das Resinas Acrílicas

De acordo com a especificação da *International Organization for Standardization* (ISO) nº 1567, podemos classificar as resinas acrílicas tendo como base os seus tipos de polimerização. Assim:

Tabela 1. Classificações das resinas acrílicas com base no seu método de polimerização (adaptada de McCabe & Walls, 2008).

<i>Tipo</i>	<i>Classe</i>	<i>Descrição</i>
1	1	Polimerização térmica, pó e líquido
1	2	Polimerização térmica, “plastic cake”
2	1	Polimerização química (auto-polimerização), pó e líquido
2	1	Polimerização química (auto-polimerização), pó e líquido para derramar
3	-	Polímeros termoplásticos
4	-	Polimerização ativada por luz
5	-	Polimerização com recurso a microondas

Na área da Medicina Dentária, as resinas acrílicas mais utilizadas na confeção de bases protéticas são as de polimerização térmica e as de polimerização química (tipos 1 e 2, respetivamente) (McCabe & Walls, 2008).

2.2.3.1. Polimerização térmica

No caso da polimerização térmica, tal como o nome indica, vai ser o calor o responsável pela ativação do peróxido de benzoílo, decompondo esta molécula após os 60°C de temperatura e dando origem aos radicais livres, os quais vão, posteriormente, reagir com os monómeros de modo a iniciar a formação e o aumento da cadeia de polímeros. A fonte de calor será a energia de micro-ondas ou a submersão da mufla em água aquecida. Tradicionalmente, para que a polimerização ocorra, deixa-se a mufla que contém o material num banho de água com temperatura constante (74°C) e por um período de 8 horas. Existe também o ciclo rápido de polimerização, no qual se coloca o material em água à temperatura ambiente passando a temperatura, de seguida, para os 74°C e aguardando 90 minutos. Passado este período de tempo, a temperatura volta a ser aumentada, desta vez para os 100°C e por um período de 60 minutos. De seguida é feito o arrefecimento, o qual dura 30 minutos e é feito em água à temperatura ambiente. No final da reação de polimerização, podemos verificar que, no material, cerca de 0,2 a 0,5% são monómeros residuais (Anusavice et al., 2013; Camacho et al., 2014).

Comparando ambos os ciclos, tradicional e rápido, concluiu-se que os ciclos de polimerização tradicionais proporcionam um resultado final melhor, uma vez que a utilização de temperaturas mais baixas e constantes, por um maior período de tempo, faz com que se evite a ebulição dos monómeros levando à formação de uma resina acrílica com menos distorções e porosidades. Deste modo, podemos obter uma melhor adaptação das bases das próteses removíveis (Marquezini & Bombonatti, 1986).

As resinas de polimerização térmica apresentam diversas vantagens, nomeadamente a nível de custo, estética, possibilidade de efetuar reparações, estabilidade dimensional, resistência, biocompatibilidade, entre outros (Camacho et al., 2014).

Relativamente à energia de micro-ondas como fonte de calor para a polimerização térmica, podemos dizer que se trata de um procedimento mais rápido, realizado com recurso a uma mufla de material não metálico. No entanto, existe maior probabilidade de o aquecimento ser excessivo, levando ao aparecimento de porosidades resultantes da ebulição dos monómeros (Anusavice et al., 2013).

2.2.3.2. Polimerização química

Nas resinas de polimerização química, a frio ou autopolimerizáveis, a temperatura ambiente é suficiente para que a polimerização ocorra. Estas resinas possuem uma amina terciária no monômero, a qual vai funcionar como ativador do peróxido de benzoílo, decompondo esta molécula e originando radicais livres, os quais se vão ligar a novos monómeros e dar origem à formação e crescimento da cadeia de polímeros, de forma semelhante ao que ocorre nas resinas de polimerização térmica (Lamb, Ellis, & Priestley, 1983).

Assim, a principal diferença entre as resinas de polimerização térmica e química é o mecanismo que vai originar a decomposição do peróxido de benzoílo e a consequente formação dos radicais livres (Anusavice et al., 2013).

No final da reação de polimerização destas resinas, podemos contar com a presença de monómeros livres numa percentagem de 3 a 5%, sendo esta uma quantidade superior à apresentada pelas resinas de polimerização térmica (Camacho et al., 2014; Vallittu, Miettinen, & Alakuijala, 1995).

As resinas autopolimerizáveis apresentam determinadas características, nomeadamente um curto tempo de trabalho, um elevado risco de distorções da prótese, propriedades mecânicas inferiores e uma maior libertação de monómeros residuais. Estas características tornam estas resinas indicadas apenas para consertos e/ou rebasamentos de próteses removíveis (McCabe & Walls, 2008).

2.2.4. Monómero residual

As substâncias que não estão integradas na cadeia de polímeros e que podem, posteriormente, libertar-se, denominam-se monómeros residuais. Estes podem ser responsáveis pela ocorrência de reações adversas locais (Gautam et al., 2012).

Como já tinha sido referido anteriormente, teoricamente, as reações de polimerização em cadeia apenas terminam quando todos os monómeros livres são consumidos (Anusavice et al., 2013). No entanto, a teoria não corresponde ao que se

observa na prática, sendo que nem todos os monómeros são convertidos em polímero e, por isso, existem sempre monómeros residuais não polimerizados (Danesh et al., 2012).

Entre os fatores que influenciam a quantidade de monómeros residuais temos como exemplo o método, o tempo e a temperatura de polimerização, a proporção pó-líquido durante a manipulação e o armazenamento da prótese em água antes da entrega ao doente (Rashid, Sheikh, & Vohra, 2015).

Os monómeros residuais vão influenciar negativamente as características físicas e mecânicas das resinas acrílicas, além de que são causadores de reações alérgicas na pele e nas mucosas (Ayaz, Durkan, Koroglu, & Bagis, 2014). Deste modo, e numa tentativa de prevenir estas ocorrências, foi criada a norma ISO 20795-1:2013, na qual se estabeleceram os limites aceitáveis relativamente à concentração de monómeros residuais presentes nas resinas acrílicas. Esta norma indica, então, que 2,2% corresponde ao limite máximo aceitável no caso das resinas de polimerização térmica e 4,5% no que diz respeito às resinas de polimerização química.

Mesmo que a reação de polimerização seja realizada nas condições laboratoriais ideais, existe sempre uma pequena quantidade de MMA que não chega a ser polimerizado (cerca de 0,2%). A maioria é libertada nas primeiras 12 horas (Crissey, 1965). Deste modo, independentemente das condições em que a polimerização ocorre, é inevitável a presença de monómeros residuais nas resinas acrílicas das bases das próteses removíveis (Rashid et al., 2015).

Apesar de ser inevitável, existem medidas que podem diminuir a quantidade de monómero residual libertada, nomeadamente evitar resinas de polimerização química em próteses removíveis, deixar a reação de polimerização decorrer por um maior período de tempo e colocar as próteses novas em água durante 24 horas, antes da entrega ao doente (Rashid et al., 2015).

2.2.5. Reações Adversas

Quando a saliva entra em contacto com a resina acrílica, promove um aumento do espaço existente entre as diversas cadeias de polímeros, uma vez que as moléculas de água facilmente penetram nessas mesmas cadeias. Assim, dá-se a difusão molecular dos

compostos não polimerizados e a libertação de monómeros residuais fica facilitada, os quais são conhecidos por serem agentes irritantes causadores de efeitos indesejáveis, nomeadamente respostas alérgicas por parte da mucosa oral como, por exemplo, uma estomatite por contacto. Estes efeitos têm sido abundantemente documentados na literatura (Bettencourt et al., 2010; Koutis & Freeman, 2001; Rashid et al., 2015).

Os efeitos mais reportados pelos doentes têm sido dor na boca e sensação de ardor. Esta última pode ser encontrada não só na mucosa oral, mas também no palato, língua e na orofaringe (Rashid et al., 2015; Van Joost, Van Ulsen, & Van Loon, 1988).

Para além das reações adversas causadas pelo contacto das mucosas orais com próteses removíveis, também a ingestão e a inalação de monómeros de MMA pode ser prejudicial. A ingestão pode afetar o trato gastrointestinal e a inalação, que pode ocorrer durante a manipulação, é responsável por uma possível irritação dos tecidos pulmonares bem como do sistema nervoso central (Rashid et al., 2015).

A pele é outro órgão que pode ser afetado durante a manipulação deste material. Deste modo, também os estudantes, protésicos e médicos podem sofrer reações adversas causadas pelo monómero de MMA (Rashid et al., 2015).

Tendo em conta os efeitos que os monómeros, os aditivos e outros produtos da polimerização podem causar, a existência ou não de toxicidade por parte destes materiais tem sido questionada e tem sido alvo de investigação (Durner, Wellner, Hickel, & Reichl, 2012; Emmeler et al., 2008).

3. Testes de Biocompatibilidade

Um material é considerado biocompatível quando, de acordo com o *Glossary of Prosthodontic Terms* da *Academy of Prosthodontics*, é capaz de permanecer em harmonia com o ambiente biológico adjacente. No entanto, o risco de reações adversas está presente em todos os biomateriais usados na área da Medicina Dentária, motivo pelo qual se torna necessário submete-los a testes de biocompatibilidade. Com isto pretende-se proteger médicos, assistentes, protésicos e doentes (Anusavice et al., 2013).

Esses testes podem ser realizados em várias espécies de animais – *in vivo* – ou em ambiente laboratorial controlado, com recurso, por exemplo, a células – *in vitro*. Por questões éticas, os testes *in vitro* são cada vez mais utilizados e, apesar de não preverem com precisão o que acontece posteriormente *in vivo*, eles mostram-nos alguns dos efeitos provocados pelos materiais e isso indica-nos a eventual necessidade de melhorar os materiais de modo a evitar os efeitos indesejáveis (Cruz, Barbosa, & Pinto, 2004; Neunzehn, Lüttenberg, & Wiesmann, 2012).

A ISO aconselha a utilização de mais do que um teste *in vitro* para o estudo da biocompatibilidade.

3.1. Teste de Redução do MTT

Em 1983 Mosmann descreveu o método colorimétrico associado ao brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), sendo este um dos mais utilizados na determinação da viabilidade celular, uma vez que os seus resultados estão diretamente relacionados com a quantidade de células vivas (Kedjarune, Charoenworalluk, & Koontongkaew, 1999; Mosmann, 1983).

Este teste tem por base a redução, catalisada pela succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias das células, dos sais amarelos de tetrazólio (Figura 10.). Esta redução vai originar cristais roxos de formazan, os quais são posteriormente dissolvidos em solventes adequados para que a absorvância das soluções possa ser lida por espectrofotometria (Branco de Andrade, 2007; Goiato, Freitas, Dos Santos, et al., 2015; Langdon, 2004).

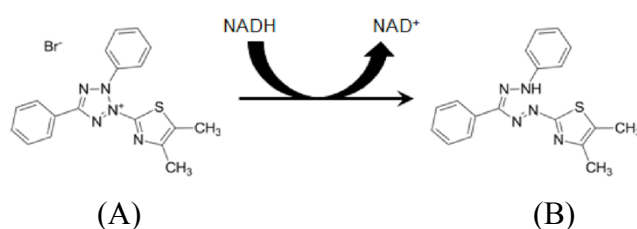


Figura 10. Redução do MTT (A) a formazan (B) (Sittampalam et al., 2018).

O teste do MTT apresenta diversas vantagens, nomeadamente a fácil implementação e a reprodutibilidade, independentemente do tipo de células utilizado, tornando favorável as variáveis custo-benefício. No entanto, é um ensaio *in vitro* e não mostra a citotoxicidade de um material nas condições de uso clínico, isto é, não tem em conta as ações protetoras da saliva e das camadas de queratina e mucina presentes na mucosa oral (Goiato, Freitas, Dos Santos, et al., 2015).

3.2. Teste de Cristal Violeta

O teste de cristal violeta constitui um outro ensaio usado para avaliar a citotoxicidade, sendo, tal como o teste do MTT, de fácil aplicação e grande reprodutibilidade (Chiba, Kawakami, & Tohyama, 1998).

O cristal violeta consiste, então, num corante que vai atravessar a membrana das células, ligando-se às proteínas e ao DNA das mesmas e dando-lhes uma cor roxa. As células não viáveis perdem a sua aderência ao plástico dos poços onde estão a crescer, acabando por se perderem durante as lavagens a estão sujeitas. Esta coloração das células viáveis que se mantêm aderentes permite que, posteriormente, seja feita uma medição colorimétrica da viabilidade celular (Feoktistova, Geserick, & Leverkus, 2016; Ishiyama et al., 1996).

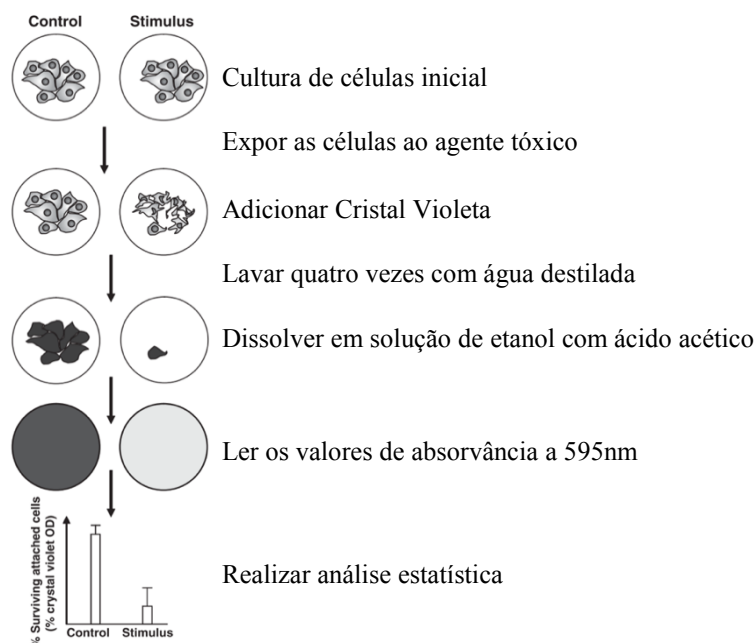


Figura 11. Esquema simplificado do ensaio do Cristal Violeta (adaptado de Feoktistova et al., 2016).

Este ensaio, apesar de ter as vantagens já referidas, apresenta também a desvantagem de ser pouco específico, uma vez que apenas quantifica as células mortas em função da capacidade funcional da membrana celular, motivo pelo qual é aconselhada a sua utilização quando integrado num conjunto de vários e diferentes ensaios de citotoxicidade. Deste modo, pode ser utilizado em conjunto com o vermelho neutro e o MTT (Chiba et al., 1998).

4. Linha Celular

As células 3T3, originárias de fibroblastos embrionários de murganho, são comumente utilizadas em ensaios de biocompatibilidade *in vitro*. George Todaro e Howard Green, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Nova Iorque, foram os primeiros a isolar e cultivar essa linha celular, em 1962. Devido ao protocolo inicial foram denominadas de 3T3, o que significa “transferência de 3 dias, inóculo 3×10^5 ”. Esta linha celular de fibroblastos tornou-se, desde então, uma linha padrão, sendo muito usada em estudos de citotoxicidade e que envolvem transfecção de DNA (Dastagir et al., 2014).

Num país em que, segundo o Barómetro da Saúde Oral da Ordem dos Médicos Dentistas (OMD) de 2017, cerca de 35,8% dos habitantes com edentulismo são portadores de prótese dentária e dadas as reações adversas, que têm sido amplamente descritas na literatura, causadas pelo contacto das próteses removíveis com os tecidos orais, torna-se importante o estudo dos seus constituintes, nomeadamente da resina acrílica, de modo a poder aferir se estamos na presença de um biomaterial citotóxico ou não.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESE EM ESTUDO

1. Objetivos

1. Avaliar, através de um estudo *in vitro*, o nível de toxicidade celular da resina ProBase® Hot;
2. Avaliar, através de um estudo *in vitro*, o nível de toxicidade celular da resina ProBase® Cold;
3. Comparar os resultados obtidos em ambas as resinas, de modo a compreender se o tipo de polimerização influencia a citotoxicidade de ambas as resinas.

2. Hipótese em Estudo

- **H₀**: Não existem diferenças de citotoxicidade entre as resinas acrílicas ProBase® Hot e ProBase® Cold;
- **H₁**: Existem diferenças de citotoxicidade entre as resinas acrílicas ProBase® Hot e ProBase® Cold.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

1.1. Resinas

Para a execução desta investigação, as seguintes resinas acrílicas, da Ivoclar Vivadent AG, foram estudadas:

1. ProBase® Hot – resina acrílica de polimerização térmica (termopolimerizável);
 - Composição:
 - Pó: PMMA, agente de amolecimento, peróxido de benzoílo, catalisadores e pigmentos.
 - Líquido: MMA, dimetacrilato (agente de ligação) e catalisadores.
2. ProBase® Cold – resina acrílica de polimerização química (autopolimerizável).
 - Composição:
 - Pó: PMMA, agente de amolecimento, peróxido de benzoílo, catalisadores e pigmentos.
 - Líquido: MMA, dimetacrilato e catalisadores.

1.2. Linha Celular

Ao longo deste trabalho foram usadas células NIH/3T3 (93061524, Sigma) (Figura 12.) de uma linha celular derivada de fibroblastos embrionários de murganho (*NIH swiss mouse embryo*).

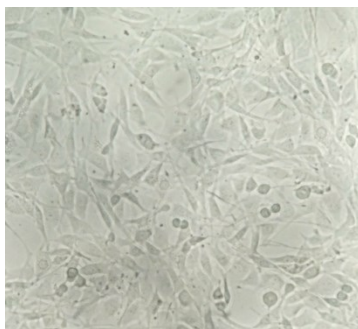


Figura 12. Células NIH/3T3 observadas ao microscópio ótico.

1.3. Reagentes

Para a execução desta investigação, foram utilizados os seguintes reagentes:

Tabela 2. Reagentes utilizados ao longo da investigação.

Reagente	Origem	Referência
Ácido acético; 99,9%	VWR	20105.292
<i>Bovine Calf Serum</i> (BCS)	Sigma	12133C
Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT); 97,5%	Sigma	M5655
Cristal Violeta	Sigma	C3886
Dimetilsulfóxido (DMSO); 99,7%	Sigma	D2650
Dimetilsulfóxido (DMSO); 99,5%	Sigma	D5879
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Sigma	D5796
Etanol; 99,9%	Carlo Erba	4146052
Gentamicina 50mg/ml	Sigma	G1397
Metanol; 99,8%	VWR	20847.320
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato, PBS) 10x	Sigma	D1408
Solução de anfoterizina B 250 µl/ml (Fungizona)	Sigma	A2942

Solução de piruvato de sódio 100mM (PNA)	Sigma	S8636
Solução de <i>Trypan Blue</i> (0,4%)	Sigma	T8154
Solução de penicilina-streptomicina (10000 U/ml Penicilina, 10 mg/ml Streptomicina) (Pen/Strep)	Sigma	P4333
Solução de Tripsina-EDTA 10x	Sigma	T4174

Todos os reagentes utilizados para a cultura de células foram adquiridos e utilizados estéreis.

1.4. Equipamentos de laboratório de cultura de células

Para a execução desta investigação, foram utilizados os seguintes equipamentos de laboratório:

Tabela 3. Equipamentos laboratoriais utilizados ao longo da investigação.

Marca e Modelo do Equipamento	Origem
Banho Maria e Circulador Grant Sub 14	Grant Instruments, Reino Unido
Câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2	LaboGene, Dinamarca
Câmara de Neubauer 8100104	Hirschmann, Alemanha
Centrifugadora Sigma 3-16PK	Sigma, Reino Unido
Giroscópio Stuart Scientific Gyro Rocker STR9	Sigma, Reino Unido
Incubadora Panasonic MCO-18AC-PE	Panasonic, Japão
Leitor de microplacas Bio-Rad modelo 680	Bio-Rad, Califórnia
Microscópio ótico Axiovert 25	Zeiss, EUA

Foram ainda utilizados diversos materiais imprescindíveis ao trabalho laboratorial, nomeadamente, micropipetas, pipetas, tubos *eppendorfs*, tubos *falcons*, pontas, lamelas, placas de 96 poços, frascos de cultura de 25 cm² (T25) e 75 cm² (T75) e água destilada autoclavada.

2. Métodos

Todo o trabalho laboratorial foi realizado em câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2 (LaboGene, Dinamarca), respeitando sempre as condições de assepsia.

2.1. Preparação dos extratos das resinas

As resinas acrílicas ProBase® Hot e ProBase® Cold foram adquiridas ao fornecedor e recebidas novas, em embalagens seladas. De seguida foram, sempre de acordo com as normas indicadas pelo fornecedor, manipuladas, polimerizadas e polidas em forma cilíndrica com diâmetro de 5mm e altura de 2mm.

Em cada um dos diversos ensaios, foram colocadas 4 peças cilíndricas (discos) da mesma resina em *falcons* com 7mL de DMEM (Figura 13.) e incubados a 37°C e 5% de CO₂ (Incubadora Panasonic MCO-18AC-PE, Panasonic, Japão), pelo período de tempo a que correspondia o ensaio a ser realizado (30 minutos, 24 horas, 7 dias, 14 dias ou 1 mês). Com isto pretendia-se simular o que acontece quando as próteses removíveis estão em contacto com a cavidade oral, nomeadamente a libertação dos monómeros residuais e outros constituintes que possam originar reações adversas.

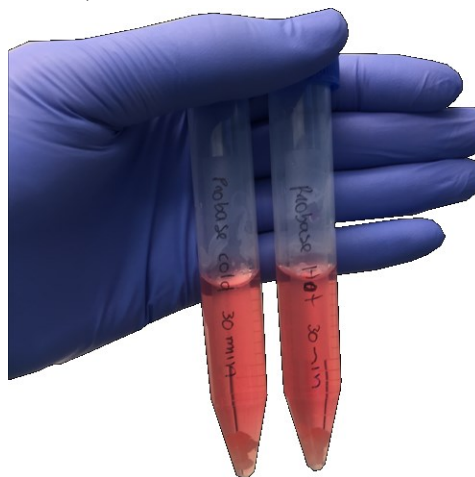


Figura 13. Falcons com 7ml de meio e 4 discos de resina.

2.2. Cultura de células

As células utilizadas ao longo da investigação, 3T3, encontravam-se inicialmente congeladas em azoto líquido, a -140°C , em 10% de DMSO. Para o seu descongelamento foram seguidos os seguintes passos:

1. Retirar as células do azoto líquido e colocar num banho a 37°C ;
2. Colocar cerca de 4mL de meio de cultura num tubo de centrífuga, juntamente com as células já descongeladas;
3. Centrifugar durante 5 minutos e a 1000 rotações por minuto (rpm);
4. Descartar os sobrenadantes dos tubos de centrífuga;
5. Ressuspender o pellet com um pouco de meio e homogeneizar bem;
6. Transferir para um frasco de cultura T75 juntamente com mais meio de cultura, de modo a perfazer 12mL.
7. Incubar a 37°C e 5% de CO_2 .

O meio de cultura utilizado foi o DMEM com glutamina (Sigma, Reino Unido), ao qual foi acrescentado 10% de BCS, 1% de Pen/Strep, 1% de PNA e 1% de Fungizona.

As células foram mantidas em cultura em meio DMEM e incubadas (Incubadora Panasonic MCO-18AC-PE, Panasonic, Japão) a 37°C e 5% de CO_2 até atingirem uma confluência situada entre os 80 e os 90%, altura em que foram submetidas a passagens para subculturas.

2.2.1. Subculturas

Quando a confluência das células em cultura atingia os 80/90%, eram seguidos os seguintes passos, de modo a iniciar subculturas:

1. Aspirar o meio e descartar;
2. Lavar a cultura de células com PBS 1x, aspirar e descartar;
3. Adicionar tripsina 1x, incubar a 37°C e aguardar cerca de 10 minutos até ao destacamento das células aderidas;

4. Adicionar meio de cultura (o triplo do volume de tripsina usado), de modo a parar a tripsinização;
5. Colocar a suspensão em tubos de centrifuga;
6. Centrifugar durante 5 minutos, a 900rpm (ou seja, 130G);
7. Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 5mL de meio de cultura;
8. Colocar em novo frasco de cultura e adicionar meio;
9. Incubar a 37°C e 5% de CO₂.



Figura 14. Frasco de cultura T25, após passagem para nova subcultura.

2.2.2. Subculturas em placas de 96 poços

Nas vésperas de realizar ensaios, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços, sendo que cada um dos poços se colocava aproximadamente 4×10^3 de células, caso o ensaio a realizar fosse o Cristal Violeta, ou 2×10^4 para o ensaio de MTT. Estes valores foram decididos após realização de ensaios de otimização para escolha do número de células por poço a utilizar. Para a subcultura de células em placas de 96 poços foram seguidos os seguintes passos:

1. Aspirar o meio de um frasco de cultura onde as células estavam a proliferar e descartar;
2. Lavar a cultura de células com PBS 1x, aspirar e descartar;
3. Adicionar tripsina 1x, incubar a 37°C e aguardar cerca de 10 minutos até ao destacamento das células aderidas;
4. Adicionar meio de cultura (o triplo do volume de tripsina usado), de modo a parar a tripsinização;
5. Colocar a suspensão em tubos de centrifuga;
6. Centrifugar durante 5 minutos, a 900rpm e 130G;

7. Verter o sobrenadante e ressuspender o pellet em 5mL de meio de cultura;
8. Retirar 20 μ L do meio de cultura com o pellet e juntar a 80 μ L de solução de *TrypanBlue*. Homogeneizar bem;
9. Preparar a câmara de Neubauer com a lamela e adicionar 10 μ L da solução obtida no ponto 8.;
10. Fazer a contagem do número de células, com recurso ao microscópio ótico invertido, e realizar os cálculos necessários, de modo a calcular a quantidade exata, em mL, de meio de cultura com células a adicionar a meio de cultura novo e homogeneizar bem;
11. Adicionar 200 μ L do meio com células obtido no ponto 10 em cada poço.

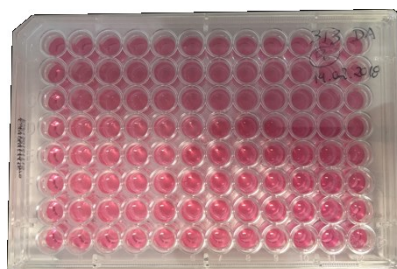


Figura 15. Placa de 96 poços cultivada com 4×10^3 de células e 200 μ L de meio de cultura em cada poço.

2.3. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada com recurso ao teste do cristal violeta e ao teste de redução do MTT, explicados anteriormente.

2.3.1. Teste de Redução do MTT

Tal como foi referido anteriormente, foram incubados 4 discos de cada uma das resinas, os quais ficaram a eluir em 7mL de meio DMEM por diferentes períodos de tempo (30 minutos, 24 horas, 7 dias, 14 dias e 1 mês) a 37°C e 5% de CO₂ (Incubadora Panasonic MCO-18AC-PE, Panasonic, Japão). As células foram mantidas em cultura e sofreram passagens, dando origem a novas subculturas, sempre que atingiam uma

confluência situada entre os 80% e os 90%. Todos os ensaios para determinação da viabilidade celular foram realizados com células que se encontravam entre a 6ª e a 10ª passagem após descongelação.

Para a realização do teste de redução do MTT foi, então, seguido o seguinte protocolo:

- **1º dia:**
 1. Semear 2×10^4 de células 3T3 em 200µl de meio suplementado, em cada um dos poços necessários para o ensaio (ver 2.2.2. Subculturas em placas de 96 poços);
 2. Incubar a 37°C e 5% de CO₂ durante 24h, de modo a permitir a adesão das células à placa de cultura;
- **2º dia:**
 1. Substituir o meio pelos extratos obtidos, nas diferentes condições a testar;
 2. Incubar a 37°C e 5% de CO₂ durante 24h;
- **3º dia:**
 1. Lavar cada um dos poços com 100µl de meio simples (não suplementado) ou PBS, com o objetivo de retirar o agente em teste;
 2. Adicionar 200µl de solução de MTT 0,5mg/ml dissolvido em meio de cultura;
 3. Incubar a 37°C e 5% de CO₂ durante 2h;
 4. Retirar a solução de MTT e lavar os poços cuidadosamente com 4 gotas de PBS 1x. Retirar a solução de PBS e remover todo o líquido por inversão da placa em papel, de modo a que este o absorva;
 5. Tendo os poços bem secos, adicionar 200µl de DMSO a cada um dos poços e solubilizar bem, pipetando os cristais de MTT que foram formados durante o período de incubação;
 6. Ler a absorvância de cada um dos poços, com recurso a um leitor de microplacas modelo 680 (Bio-Rad, Califórnia), com o comprimento de onda de 595nm.

2.3.2. Teste do Cristal Violeta

Tal como descrito para o teste de redução do MTT, foram incubados 4 discos de cada uma das resinas, os quais ficaram a eluir em 7mL de meio DMEM por diferentes períodos de tempo (30 minutos, 24 horas, 7 dias e 14 dias) a 37°C e 5% de CO₂ (Incubadora Panasonic MCO-18AC-PE, Panasonic, Japão). As células sofreram passagens, dando origem a novas subculturas, sempre que atingiam uma confluência situada entre os 80% e os 90%. Todos os ensaios para determinação da viabilidade celular foram realizados quando a cultura de células se encontrava entre a 6^a e a 10^a passagem após descongelação.

Para a realização do teste do Cristal Violeta foi, então, seguido o seguinte protocolo:

- **1º dia:**
 1. Semear 4×10^3 de células 3T3 em 200µl de meio suplementado, em cada um dos poços necessários para o ensaio, tal como foi descrito no ponto 2.2.2. Subculturas em placas de 96 poços;
 2. Incubar a 37°C e 5% de CO₂ durante 24h;
- **2º dia:**
 1. Substituir o meio pelos extratos a testar;
 2. Incubar a 37°C e 5% de CO₂ durante 24h;
- **3º dia:**
 1. Lavar cada um dos poços com algumas gotas de PBS 1x, com o objetivo de retirar o material em teste e as células não aderentes;
 2. Fixar as células aderentes com 100µl, em cada um dos poços, de etanol gelado a 96%, por um período de tempo de 10 minutos;
 3. Adicionar 100µl, em cada um dos poços, da solução de Cristal Violeta a 0,1% em 10% de etanol e incubar à temperatura ambiente, durante 10 minutos;
 4. Lavar os poços com 200µl de água destilada, com o objetivo de retirar o corante que ficou fora das células. Repetir este processo 4 vezes;
 5. Ressuspender as células aderentes e respetivo corante em 200µl de solução de etanol a 96% com ácido acético a 1%;

6. Colocar a placa a agitar pelo período de 30 minutos e à temperatura ambiente;
7. Ler a absorvância de cada um dos poços, com recurso a um leitor de microplacas modelo 680 (Bio-Rad, Califórnia), com o comprimento de onda de 595nm.

A. Ensaio I: OTIMIZAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS

Ao longo da placa de 96 poços foram cultivadas diferentes concentrações de células, sendo que cada duas colunas levou uma concentração distinta.

Na placa para otimização do número de células a utilizar para o ensaio do Cristal Violeta foram cultivadas as seguintes concentrações células: 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 . Relativamente ao ensaio do MTT, as concentrações utilizadas para a otimização foram: 4×10^3 , 6×10^3 , 8×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 .

Ambas as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por um período de 24 horas. Após este período de tempo, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura novo, tendo as placas voltado para a incubadora por mais 24 horas. Cada concentração de células foi testada duas vezes, sendo que, de cada uma das vezes, com 8 réplicas.

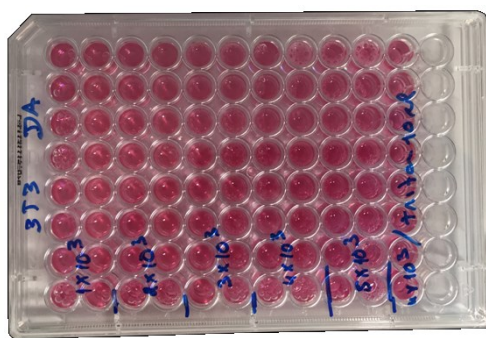


Figura 16. Placa de 96 poços utilizada na otimização do número de células para o ensaio do Cristal Violeta.

B. Ensaio II: ESCOLHA DO CONTROLO DE MORTE CELULAR

Uma vez que o objetivo desta investigação passa por identificar uma possível citotoxicidade por parte de duas resinas acrílicas, diversos agentes com citotoxicidade conhecida foram postos em contacto com as células em cultura. Deste modo, foram usados: Metanol 2,5%, Metanol 5%, Etanol 1,75%, Etanol 3,5%, DMSO 2,5%, DMSO 5% e Triton x 100 2,45%.

As placas foram então cultivadas com 4×10^3 de células em 200 μ l de meio de cultura e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas. Passadas as 24 horas, o meio foi retirado e substituído por novo meio, ao qual foi adicionado o agente tóxico nas concentrações descritas anteriormente. Feito isto, a placa foi novamente incubada por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂.

Para cada composto tóxico e respetiva concentração foram realizadas 8 réplicas, dentro do mesmo ensaio.

No final foi realizada um ensaio de Cristal Violeta, de modo a escolher o composto mais conveniente para ser usado como controlo de morte celular.

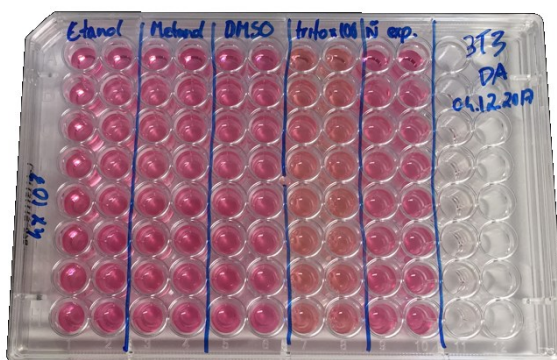


Figura 17. Placa de 96 poços utilizada na escolha do controlo de morte celular.

C. Ensaio III: EXTRATOS DE RESINAS ACRÍLICAS EM CONTACTO COM 4x10³ CÉLULAS – TESTE DO CRISTAL VIOLETA

Previamente, quatro discos de cada uma das resinas foram colocados falcons, juntamente com 7mL de meio de cultura e incubados a 37°C e 5% de CO₂, pelo período de tempo a que correspondia o ensaio a ser realizado (30 minutos, 24 horas, 7 dias ou 14 dias). Com estas incubações preparámos extratos com diferentes tempos de incubação e, consequentemente, com diferentes quantidades de monómeros eluídos.

Em cada um dos 96 poços das placas foi cultivado 4x10³ células, em 200µl de meio de cultura. De seguida, as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂, pelo período de 24 horas.

Passadas as 24 horas de incubação, foi removido o meio e adicionado o meio que esteve em contacto com as resinas durante os diversos períodos de tempo. Este meio foi adicionado em cinco diluições diferentes ($\frac{1}{16}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e não diluído). Para cada resina foram testados os 4 períodos de tempo e para cada um deles foram testadas as 5 diluições, sendo que para cada diluição foi usada uma coluna (8 poços).

Para controlo de viabilidade celular foi usada uma coluna que levou sempre 200µl de meio não exposto (DMEM suplementado) e para controlo de morte celular foi usada uma coluna que levou 190µl de meio não exposto juntamente com 10µl de DMSO puro.

As placas foram novamente incubadas a 37°C e 5% de CO₂, pelo período de 24 horas.

Tendo terminado o novo período de 24 horas, foi seguido o protocolo para o 3º dia do ensaio do Cristal Violeta, descrito anteriormente.

**D. Ensaio IV: EXTRATOS DE RESINAS ACRÍLICAS EM CONTACTO COM
2x10⁴ CÉLULAS – TESTE DE REDUÇÃO DO MTT**

Este ensaio foi realizado de forma similar ao Ensaio III, acrescentando-se apenas extratos com 1 mês de incubação, de modo a verificar se daria origem a diferenças significativas. O número de células cultivado por poço foi de 2x10⁴ células. As diluições utilizadas para os extratos incubados por diferentes períodos de tempo foram semelhantes.

No 3º dia do ensaio, o protocolo seguido foi o do teste de redução do MTT, já descrito.

Foram realizadas 3 repetições independentes deste ensaio para cada resina/tempo/diluição, com 8 réplicas em cada um dos parâmetros.

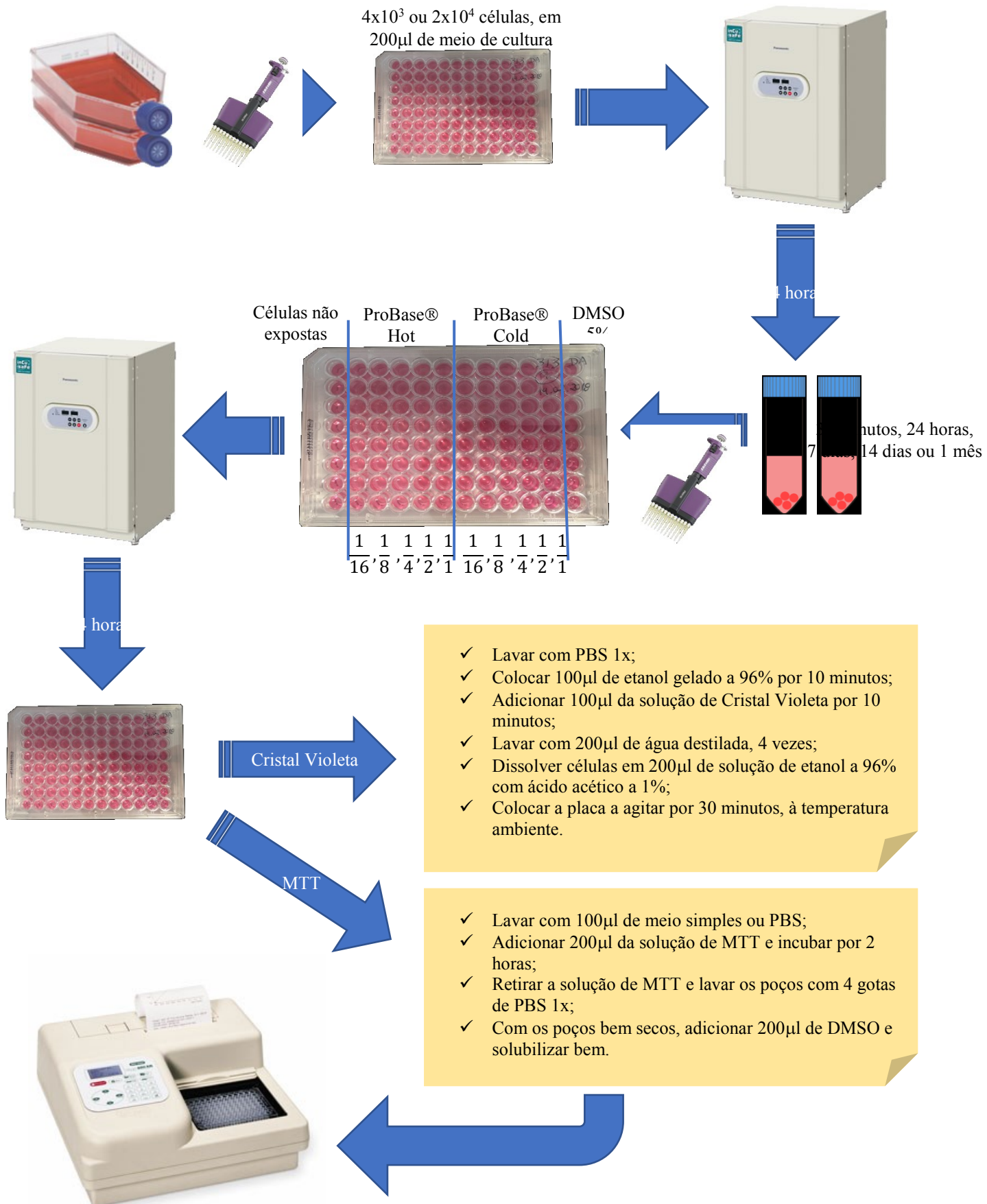


Figura 18. Esquema representativo do fluxo de trabalho seguido nos ensaios III e IV.

3. Análise Estatística

Todas as leituras de absorvância obtidas foram convertidas a percentagens de viabilidade, multiplicando o valor de absorvância lido por 100 e dividindo esse resultado pela absorvância média obtida nas células não expostas. De seguida, os valores foram introduzidos no *software* SPSS® (*Statistical Package for the Social Sciences*) e analisados estatisticamente, aceitando-se uma significância de 5%.

Foi utilizado o ANOVA Fatorial, após se ter verificado que todos os dados se encontravam dentro dos parâmetros de normalidade. No que diz respeito à análise de diferenças significativas, foi utilizado o teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD.

IV. RESULTADOS

A. Ensaio I: OTIMIZAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS

Este ensaio foi realizado com o objetivo de escolher o número de células mais adequado para cada um dos testes a realizar (Cristal Violeta e MTT).

Os resultados obtidos foram os seguintes:

1. Teste do Cristal Violeta:

Tabela 4. Valores médios de absorvância (595nm) e respetivo desvio padrão referentes a cada um dos números de células usados e obtidos através do teste do Cristal Violeta.

Número de células	Valor de absorvância (média)	Desvio Padrão
1×10^3	0,326	0,004
2×10^3	0,496	0,013
3×10^3	0,787	0,045
4×10^3	1,294	0,059
5×10^3	1,652	0,031

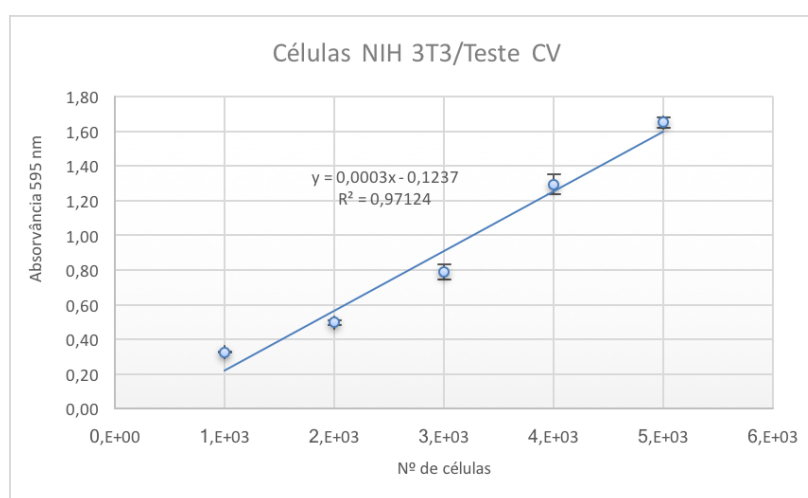


Gráfico 1. Valores médios de absorvância (595nm) \pm desvio padrão referentes a cada um dos números de células usados e obtidos através do teste do Cristal Violeta.

Após análise da tabela 4. e do gráfico 1., o número de células escolhido para usar ao longo da investigação, em ensaios com recurso ao teste do Cristal Violeta, foi 4×10^3 . Este valor foi escolhido tendo em conta o limite de deteção do aparelho de espectrofotometria, que se situa entre os valores 0,2 e 1 de absorvância, e a lei de Lambert-Beer, a qual estabelece uma relação entre a absorvância e o número de células.

2. Teste de redução do MTT:

Tabela 5. Valores médios de absorvância (595nm) e respetivo desvio padrão referentes a cada um dos números de células usados e obtidos através do teste de redução do MTT.

Número de células	Valor de absorvância (média)	Desvio Padrão
4×10^3	0,330	0,015
6×10^3	0,583	0,016
8×10^3	0,648	0,075
1×10^4	0,762	0,005
2×10^4	1,122	0,005

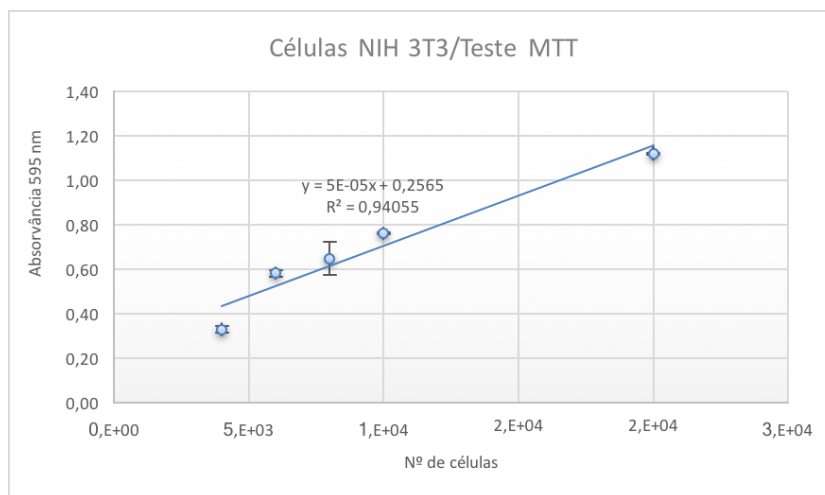


Gráfico 2. Valores médios de absorvância (595nm) \pm desvio padrão referentes a cada um dos números de células usados e obtidos através do teste de redução do MTT.

Após análise da tabela 5. e do gráfico 2., o número de células escolhido para usar ao longo da investigação, em ensaios com recurso ao teste de redução do MTT, foi 2×10^4 ,

tendo em conta o limite de detecção do aparelho de espectrofotometria, que se situa entre os valores 0.2 e 1 de absorvância, e a lei de Lambert-Beer, a qual estabelece uma relação entre a absorvância e o número de células.

B. Ensaio II: ESCOLHA DO CONTROLO DE MORTE CELULAR

Para a escolha do controlo de morte celular foram usados os seguintes compostos: Metanol (2,5% e 5%), Etanol (1,75% e 3,5%), DMSO (2,5% e 5%) e Triton X-100 (2,45% e 4,90%). Após estes compostos estarem em contacto com as células, pelo período de 24 horas, foi realizado o teste do Cristal Violeta e os valores de absorvância foram lidos. Os valores obtidos foram convertidos a percentagens de viabilidade celular, para uma melhor interpretação dos resultados, os quais se encontram descritos na tabela 6.:

Tabela 6. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão referentes a cada um dos compostos utilizados.

	Metanol		Etanol		DMSO		Triton X-100	
	2,5%	5,0%	1,75%	3,50%	2,5%	5,0%	2,45%	4,90%
Média (% de viabilidade celular)	72,6	57,7	62,8	67,7	37,4	23,4	21,6	25,8
Desvio Padrão	7,6	5,3	7,4	6,4	5,9	3,8	5,1	3,7

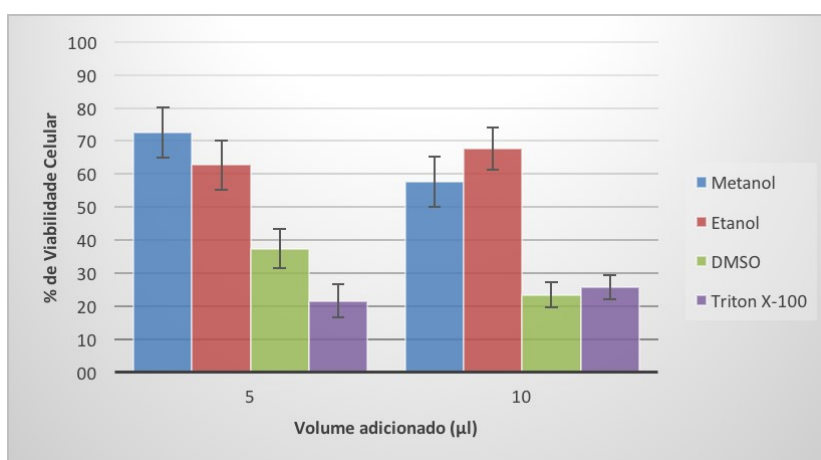


Gráfico 3. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão referentes a cada um dos compostos utilizados.

Com base na análise da Tabela 6. e do Gráfico 3., foi escolhido o DMSO a 5% (10µl de DMSO + 190µl de meio) para uso como controlo de morte celular. O Triton X-100, apesar de ter originado uma viabilidade celular mais baixa, não se afastou muito dos valores alcançados pelo DMSO. Entre estes dois, que apresentam resultados muito semelhantes, optou-se pelo DMSO, excluindo-se o Triton X-100 devido à sua elevada viscosidade que o torna difícil de pipetar com precisão.

C. Ensaio III: EXTRATOS DE RESINAS ACRÍLICAS EM CONTACTO COM 4×10^3 CÉLULAS – TESTE DO CRISTAL VIOLETA

Após ter sido realizado o teste do Cristal Violeta, foram lidas as placas em estudo e, de seguida, os valores de absorvância foram convertidos em percentagens de viabilidade celular.

1. 30 minutos:

Os resultados obtidos através do teste do Cristal Violeta e após colocar os extratos dos 30 minutos em contacto com as células NIH/3T3 estão descritos na Tabela 7. e no Gráfico 4.:

Tabela 7. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 30 minutos (Ensaio III).

			Média	Desvio Padrão
30 minutos	ProBase® Hot	1:16	74,0	5,3
		1:8	86,5	20,5
		1:4	81,2	10,8
		1:2	81,6	5,0
		Não diluído	89,6	18,2
	ProBase® Cold	1:16	97,0	12,9
		1:8	81,2	12,6
		1:4	81,4	12,9
		1:2	84,9	13,4
		Não diluído	124,9	19,6
	DMSO		86,9	11,0

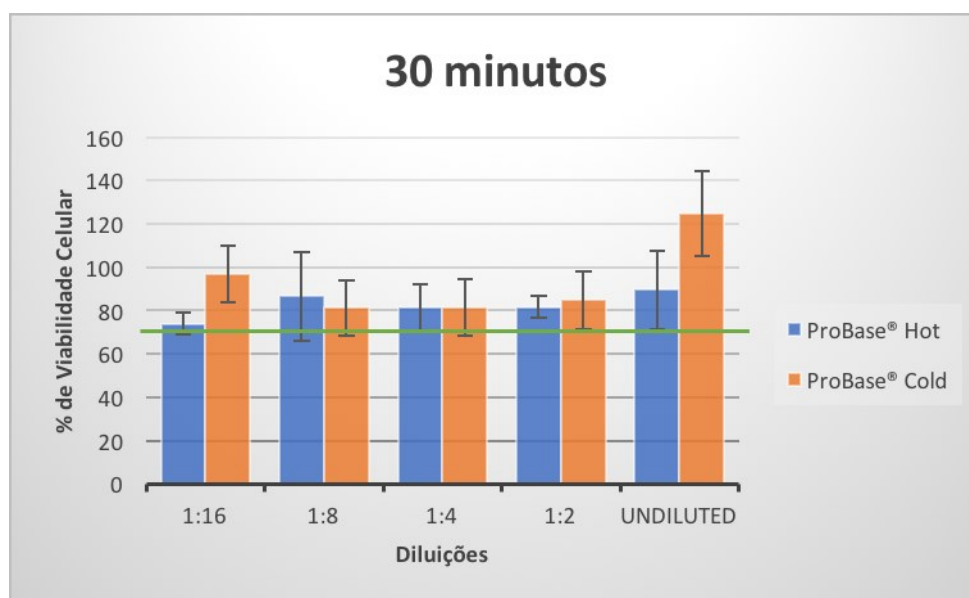


Gráfico 4. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 30 minutos (Ensaio III). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.

Após colocar as células em contacto com os extratos dos 30 minutos das resinas ProBase®, é possível verificar que a resina ProBase® Hot origina uma viabilidade celular

mais baixa em todas as diluições (exceto na diluição 1:8), quando comparada com a ProBase® Cold.

De acordo com o teste Tukey HSD, apenas nas diluições 1:16 e 1:1 (não diluído) foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na viabilidade dos fibroblastos 3T3 quando expostos aos extratos dos 30 minutos (Tabela 8.).

Tabela 8. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio III – 30 minutos).

Teste de Tukey HSD – 30 minutos (Ensaio III)

Diluição	1:16	1:8	1:4	1:2	1:1
<i>p-value</i>	0,033	1,000	1,000	1,000	< 0,001

De qualquer maneira, nenhuma das duas resinas origina percentagens de viabilidade celular inferiores a 70%, sendo que este é o limite para afirmar que um material é citotóxico, de acordo com a ISO 10993-5:2009.

2. 24 horas:

Os extratos das 24 horas em contacto com as células NIH/3T3 originaram, após realização do teste do Cristal Violeta, os seguintes resultados (Tabela 9. e Gráfico 5.):

Tabela 9. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 24 horas (Ensaio III).

			Média	Desvio Padrão
24 horas	ProBase® Hot	1:16	87,3	8,7
		1:8	82,5	13,0
		1:4	87,1	11,4
		1:2	87,9	18,3
		Não diluído	86,9	17,3
	ProBase® Cold	1:16	79,5	9,7
		1:8	94,1	14,1
		1:4	82,4	11,3
		1:2	96,4	10,8
		Não diluído	93,1	9,8
	DMSO		94,6	10,6

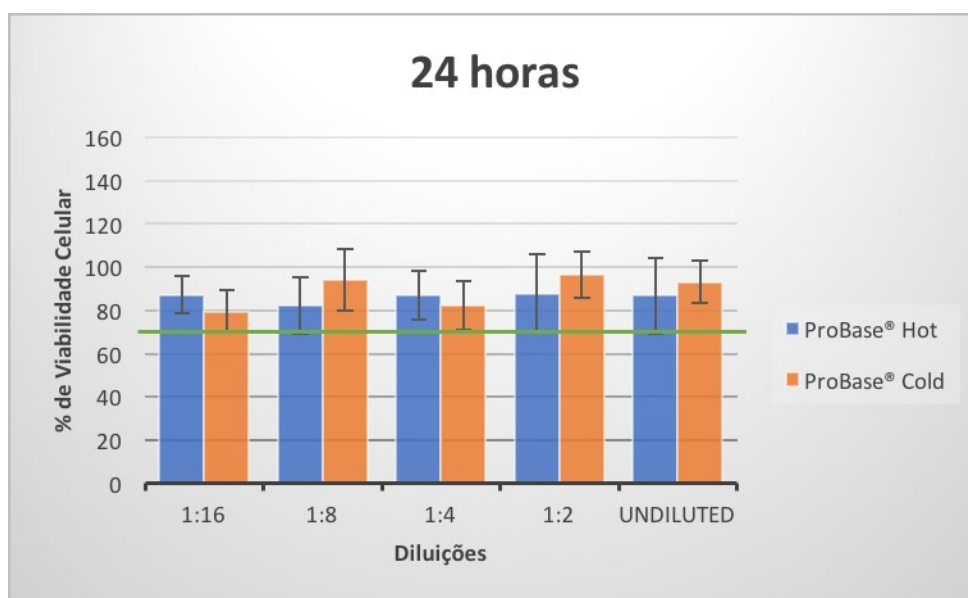


Gráfico 5. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 24 horas (Ensaio III). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.

Após 24 horas, é possível verificar que a resina ProBase® Hot origina uma viabilidade celular mais baixa nas diluições 1:8, 1:2 e 1:1, quando comparada com a

ProBase® Cold. No entanto, e mais uma vez, nenhuma das duas resinas origina percentagens de viabilidade celular inferiores aos 70% definidos pela ISO 10993-5:2009.

De acordo com o teste Tukey HSD, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na viabilidade dos fibroblastos 3T3 quando expostos aos extratos das 24 horas, independentemente da diluição em estudo (Tabela 10.).

Tabela 10. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio III – 24 horas).

Teste de Tukey HSD – 24 horas (Ensaio III)

Diluição	1:16	1:8	1:4	1:2	1:1
<i>p-value</i>	1,000	0,991	1,000	1,000	1,000

3. 7 dias:

Os extratos dos 7 dias em contacto com as células NIH/3T3, originaram, após realização do teste do Cristal Violeta, os resultados descritos na Tabela 11. e apresentados no Gráfico 6.:

Tabela 11. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 7 dias (Ensaio III).

			Média	Desvio Padrão
7 dias	ProBase® Hot	1:16	95,1	10,3
		1:8	90,0	7,0
		1:4	86,5	7,9
		1:2	91,3	10,8
		Não diluído	97,6	11,3
	ProBase® Cold	1:16	93,6	12,7
		1:8	108,9	11,0
		1:4	91,9	13,5
		1:2	91,3	13,9
		Não diluído	87,7	12,4
	DMSO		88,2	16,8

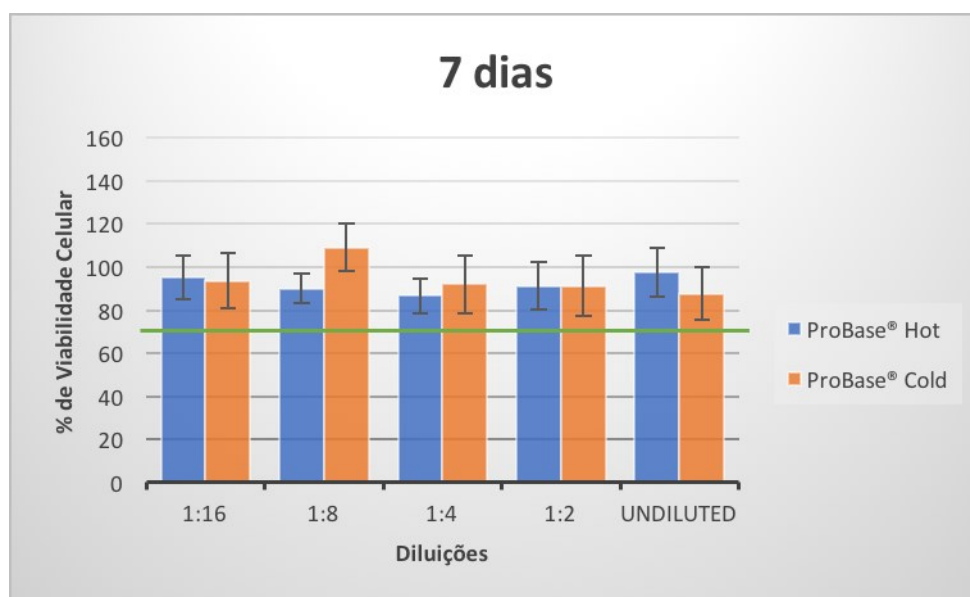


Gráfico 6. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 7 dias (Ensaio III). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.

Ao fim de 7 dias, é visível que a resina ProBase® Hot origina uma viabilidade celular mais baixa nas diluições 1:8 e 1:4, quando comparada com a ProBase® Cold. No entanto, e mais uma vez, nenhuma das duas resinas origina percentagens de viabilidade celular inferiores aos 70% definidos pela ISO 10993-5:2009.

De acordo com o teste Tukey HSD, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular após contacto com os extratos dos 7 dias, independentemente da diluição em estudo (Tabela 12.).

Tabela 12. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio III – 7 dias).

Teste de Tukey HSD – 7 dias (Ensaio III)

Diluição	1:16	1:8	1:4	1:2	1:1
<i>p-value</i>	1,000	0,268	1,000	1,000	1,000

4. 14 dias:

Após realização do teste do Cristal Violeta aos extratos dos 14 dias em contacto com as células NIH/3T3, os seguintes resultados foram obtidos (Tabela 13. e Gráfico 7.):

Tabela 13. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 14 dias (Ensaio III).

			Média	Desvio Padrão
14 dias	ProBase® Hot	1:16	81,3	5,3
		1:8	81,3	4,0
		1:4	82,4	6,6
		1:2	86,5	4,0
		Não diluído	81,5	4,3
	ProBase® Cold	1:16	82,7	4,6
		1:8	76,7	3,6
		1:4	82,0	3,5
		1:2	83,5	5,6
		Não diluído	84,5	3,7
	DMSO		51,3	5,0

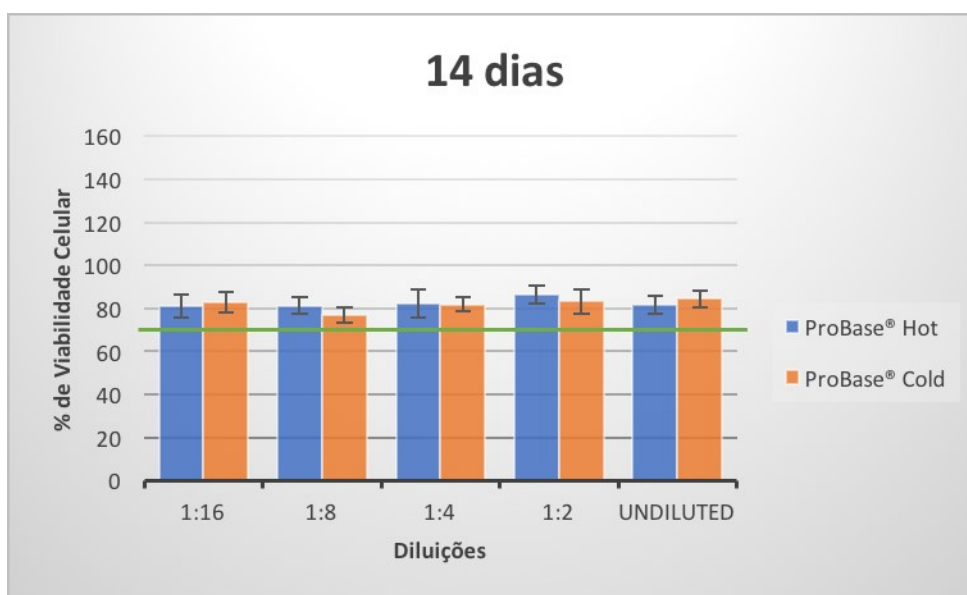


Gráfico 7. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 14 dias (Ensaio III). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.

Podemos verificar que a resina ProBase® Hot originou uma viabilidade celular mais baixa nas diluições 1:16 e 1:1, quando comparada com a ProBase® Cold.

De acordo com o teste Tukey HSD, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular após contacto com os extratos dos 14 dias, independentemente da diluição em estudo (Tabela 14.).

Tabela 14. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio III – 14 dias).

Teste de Tukey HSD – 14 dias (Ensaio III)

Diluição	1:16	1:8	1:4	1:2	1:1
<i>p-value</i>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Apesar de, aos 14 dias, se ter obtido os valores mais baixos de viabilidade celular, nenhuma das duas resinas origina percentagens de viabilidade celular inferiores aos 70% definidos pela ISO 10993-5:2009, pelo que não podem ser consideradas citotóxicas.

De seguida, foram realizados testes de avaliação de fatores e sua interação, cujos resultados se encontram na Tabela 15.

Tabela 15. Testes de avaliação de fatores e sua interação, de acordo com os resultados obtidos no Ensaio III.

		Significância	Eta parcial quadrado
Testes de avaliação de fatores e sua interação	resina	0,002	0,034
	diluição	<0,001	0,072
	tempo	<0,001	0,122
	resina * diluição	0,268	0,018
	resina * tempo	0,007	0,042
	diluição * tempo	<0,001	0,158
	resina * diluição * tempo	<0,001	0,167

Analisando a tabela 15., e tendo em conta que o valor de significância aceite é de 0,05, verifica-se a existência de diferenças significativas em relação à média em todos os fatores analisados, com exceção do fator “resina * diluição” que não mostrou diferenças significativas. Ou seja, não existem diferenças significativas entre as diversas diluições de cada resina.

Analisando a coluna do Eta parcial quadrado, sabemos que este representa uma medida de quantificação da intensidade de um fator e que, assim, quanto maior for o seu valor, maior será intensidade do fator em questão. Deste modo, os tempos em estudo representaram o fator com maior intensidade e as diferentes resinas demonstraram ser o fator com menor intensidade, ou seja, o fator menos responsável pela existência de diferenças estatisticamente significativas.

D. Ensaio IV: EXTRATOS DE RESINAS ACRÍLICAS EM CONTACTO COM 2×10^4 CÉLULAS – TESTE DE REDUÇÃO DO MTT

Após ter sido realizado o teste de redução do MTT, foram lidas as placas relativas aos diversos períodos de incubação e, de seguida, os valores de absorvância foram convertidos em percentagens de viabilidade celular para melhor interpretação dos resultados.

1. 30 minutos:

Os resultados obtidos através do teste de Redução do MTT e após colocar os extratos dos 30 minutos em contacto com as células NIH/3T3 estão descritos na Tabela 16. e no Gráfico 8.:

Tabela 16. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 30 minutos (Ensaio IV).

			Média	Desvio Padrão
30 minutos	ProBase® Hot	1:16	98,0	9,0
		1:8	90,0	6,9
		1:4	85,0	9,7
		1:2	81,1	7,5
		Não diluído	77,4	11,2
	ProBase® Cold	1:16	99,0	8,5
		1:8	94,5	9,6
		1:4	96,9	10,9
		1:2	99,5	10,7
		Não diluído	95,1	7,8
	DMSO		9,4	6,0

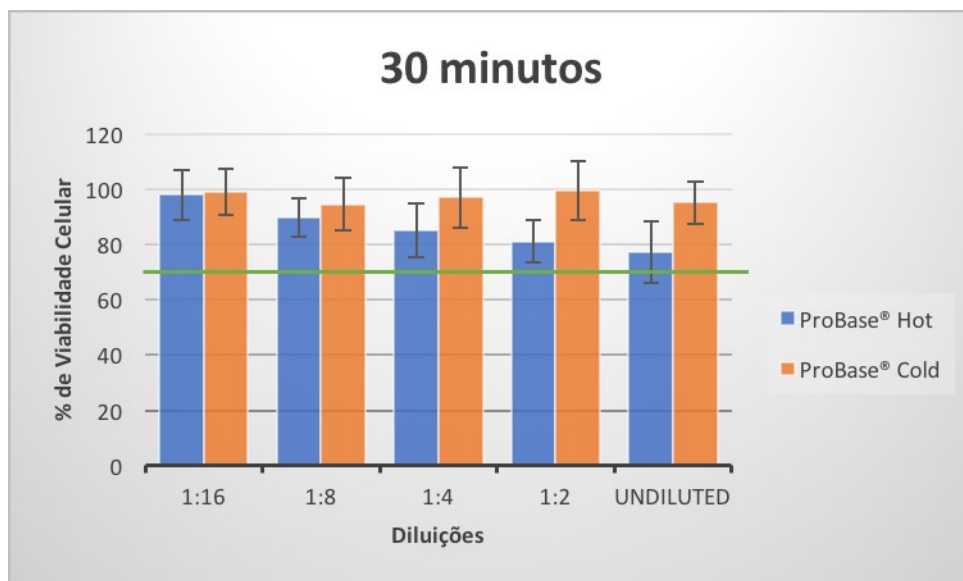


Gráfico 8. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 30 minutos (Ensaio IV). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.

Após colocar as células em contacto com as eluições dos 30 minutos das resinas ProBase®, é possível verificar que a resina ProBase® Hot origina uma viabilidade celular mais baixa em todas as diluições.

De acordo com o teste Tukey HSD, apenas nas diluições 1:4, 1:2 e 1:1 (não diluído) foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (Tabela 17.).

Tabela 17. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio IV – 30 minutos).

Teste de Tukey HSD – 30 minutos (Ensaio IV)

Diluição	1:16	1:8	1:4	1:2	1:1
<i>p-value</i>	1,000	0,992	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Ainda assim, nenhuma das resinas originou percentagens de viabilidade celular inferiores a 70%, sendo que este é o limite para afirmar que um material é citotóxico, de acordo com a ISO 10993-5:2009.

2. 24 horas:

Os extratos das 24 horas em contacto com as células NIH/3T3, originaram, após realização do teste de Redução do MTT, os seguintes resultados (Tabela 18. e Gráfico 9.):

Tabela 18. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 24 horas (Ensaio IV).

			Média	Desvio Padrão
24 horas	ProBase® Hot	1:16	102,7	9,9
		1:8	96,8	9,5
		1:4	94,5	8,7
		1:2	96,6	8,9
		Não diluído	93,6	8,4
	ProBase® Cold	1:16	101,5	6,8
		1:8	96,6	10,6
		1:4	93,5	14,5
		1:2	100,0	8,1
		Não diluído	91,2	7,9
	DMSO		9,3	3,9

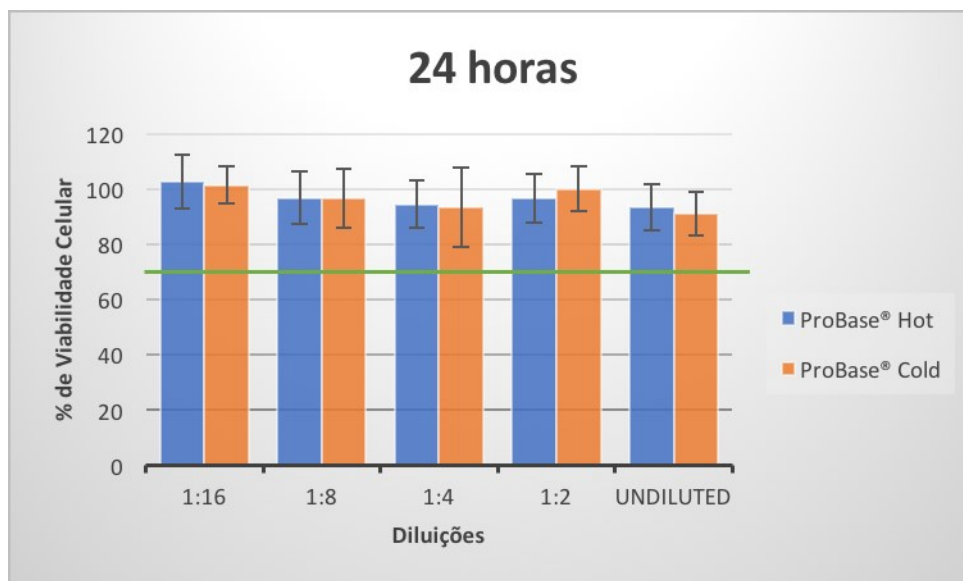


Gráfico 9. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 24 horas (Ensaio IV). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.

Contrariamente ao que aconteceu nos 30 minutos, após 24 horas, é possível verificar que a resina ProBase® Hot origina uma viabilidade celular mais alta em praticamente todas as diluições, quando comparada com a ProBase® Cold.

Apenas a diluição 1:2 apresentou uma percentagem de viabilidade celular mais baixa por parte da resina ProBase® Hot.

De acordo com o teste Tukey HSD, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas após exposição dos fibroblastos 3T3 aos extratos incubados por 24 horas (Tabela 19.).

Tabela 19. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio IV – 24 horas).

Teste de Tukey HSD – 24 horas (Ensaio IV)

Diluição	1:16	1:8	1:4	1:2	1:1
<i>p-value</i>	1,000	1,000	1,000	1,000	0,909

Ainda assim, todas as percentagens de viabilidade celular foram superiores aos 70% definidos pela ISO 10993-5:2009.

3. 7 dias:

Os extratos dos 7 dias em contacto com as células NIH/3T3, originaram, após realização do teste de Redução do MTT, os resultados descritos na Tabela 20. e apresentados no Gráfico 10.:

Tabela 20. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 7 dias (Ensaio IV).

			Média	Desvio Padrão
7 dias	ProBase® Hot	1:16	98,0	8,2
		1:8	94,7	5,1
		1:4	93,3	4,9
		1:2	91,9	4,3
		Não diluído	87,8	5,1
	ProBase® Cold	1:16	95,3	7,7
		1:8	93,3	7,1
		1:4	90,4	6,3
		1:2	90,1	7,0
		Não diluído	82,6	6,4
	DMSO		7,6	3,1

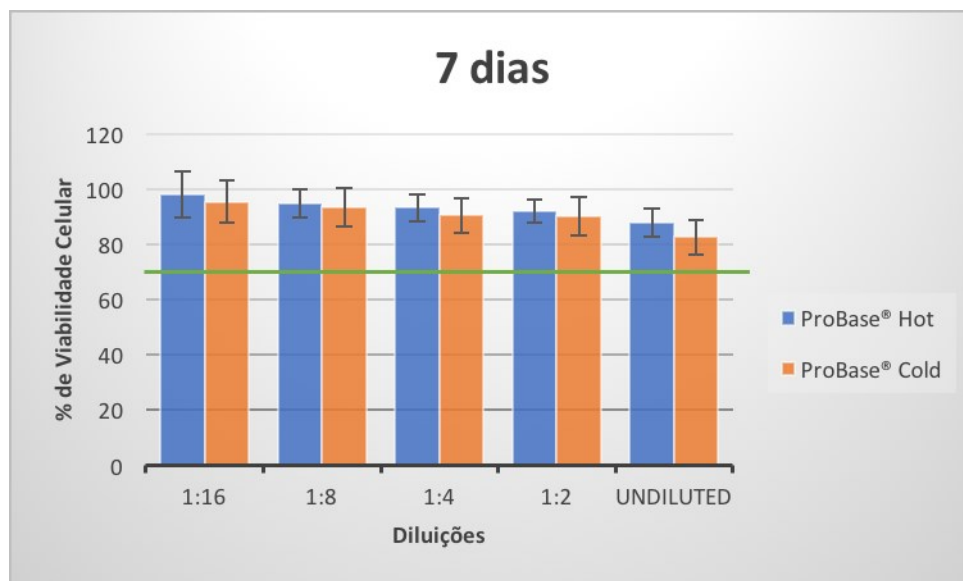


Gráfico 10. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 7 dias (Ensaio IV). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.

Após 7 dias, a resina ProBase® Hot originou percentagens de viabilidade celular mais altas em todas as diluições, quando comparadas com as obtidas pela resina ProBase® Cold.

Após contacto com os extratos dos 7 dias, e de acordo com o teste Tukey HSD, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na viabilidade dos fibroblastos 3T3 (Tabela 21.).

Tabela 21. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio IV – 7 dias).

Teste de Tukey HSD – 7 dias (Ensaio IV)

Diluição	1:16	1:8	1:4	1:2	1:1
<i>p-value</i>	1,000	1,000	1,000	1,000	0,886

Todas as percentagens de viabilidade celular foram superiores aos 70% definidos pela ISO 10993-5:2009.

4. 14 dias:

Após realização do teste de Redução do MTT aos extratos dos 14 dias em contacto com as células NIH/3T3, os seguintes resultados foram obtidos (Tabela 22. e Gráfico 11.):

Tabela 22. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 14 dias (Ensaio IV).

			Média	Desvio Padrão
14 dias	ProBase® Hot	1:16	84,4	9,0
		1:8	81,1	7,7
		1:4	80,8	6,9
		1:2	80,0	5,5
		Não diluído	77,6	5,5
	ProBase® Cold	1:16	96,2	9,6
		1:8	93,8	7,1
		1:4	91,3	7,5
		1:2	91,5	7,0
		Não diluído	80,3	11,3
	DMSO		8,1	1,7

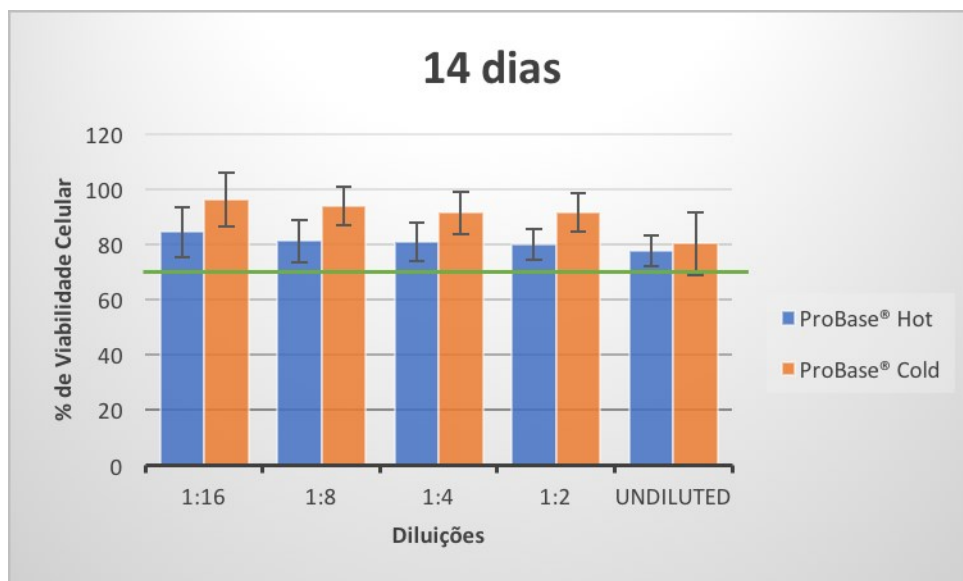


Gráfico 11. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 14 dias (Ensaio IV). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.

Após 14 dias, a situação inverteu-se e a resina ProBase® Hot originou percentagens de viabilidade celular mais baixas em todas as diluições, quando comparadas com as obtidas pela resina ProBase® Cold.

Após análise com o teste Tukey HSD, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na viabilidade dos fibroblastos 3T3 nas diluições 1:16, 1:8, 1:4 e 1:2 (Tabela 23.).

Tabela 23. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio IV – 14 dias).

Teste de Tukey HSD – 14 dias (Ensaio IV)

Diluição	1:16	1:8	1:4	1:2	1:1
<i>p-value</i>	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001	1,000

De qualquer maneira, todas as percentagens de viabilidade celular superaram os 70% definidos pela ISO 10993-5:2009.

5. 1 mês:

Neste ensaio foi acrescentado o tempo 1 mês, uma vez que o fator tempo tinha sido aquele a produzir diferenças mais significativas e, também, uma vez que 1 mês após a entrega da prótese, os Médicos Dentistas voltam a ter contacto com o doente, na consulta de controlo. Assim, após realização do teste de Redução do MTT aos extratos dos 30 dias em contacto com as células NIH/3T3, os valores de absorvância foram lidos e os seguintes resultados foram obtidos (Tabela 24. e Gráfico 12.):

Tabela 24. Valores médios de percentagem de viabilidade celular e respetivo desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 1 mês (Ensaio IV).

			Média	Desvio Padrão
1 mês	ProBase® Hot	1:16	89,3	4,2
		1:8	93,8	3,1
		1:4	90,1	2,6
		1:2	90,3	4,1
		Não diluído	87,9	3,9
	ProBase® Cold	1:16	92,9	3,6
		1:8	94,8	4,7
		1:4	92,1	5,8
		1:2	92,7	5,4
		Não diluído	89,7	6,9
	DMSO		5,9	1,0

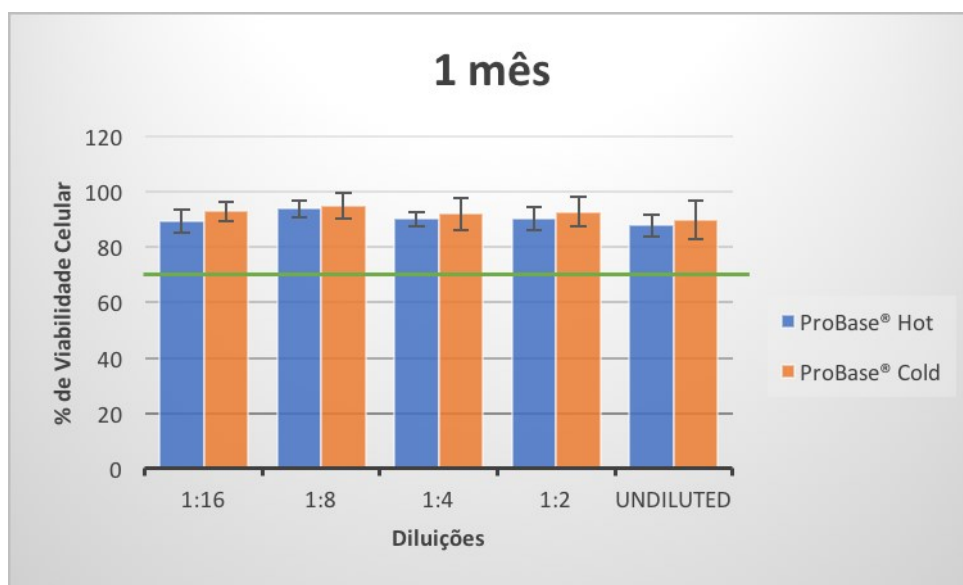


Gráfico 12. Valores médios de percentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão das células 3T3 quando expostas às resinas ProBase® por 1 mês (Ensaio IV). A verde encontra-se assinalado o limite dos 70%, definido pela ISO 10993-5:2009 para poder concluir que um material é citotóxico.

Neste tempo as percentagens de viabilidade celular de ambas as resinas atingiram valores muito próximos. No entanto, foi a resina ProBase® Hot que originou percentagens de viabilidade celular mais baixas, independentemente da diluição em causa.

Recorrendo ao teste Tukey HSD, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na viabilidade dos fibroblastos 3T3, após contacto com os extratos incubados por 1 mês (Tabela 25.).

Tabela 25. Teste posteriori de comparações múltiplas de Tukey HSD (Ensaio IV – 1 mês).

Teste de Tukey HSD – 1 mês (Ensaio IV)

Diluição	1:16	1:8	1:4	1:2	1:1
<i>p-value</i>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Todas as percentagens de viabilidade celular superaram os 70% definidos pela ISO 10993-5:2009.

De seguida, foram realizados testes de avaliação de fatores e sua interação, cujos resultados se encontram na Tabela 26.

Tabela 26. Testes de avaliação de fatores e sua interação, de acordo com os resultados obtidos no Ensaio IV.

		Significância	Eta parcial quadrado
Testes de avaliação de fatores e sua interação	resina	<0,001	0,055
	diluição	<0,001	0,122
	tempo	<0,001	0,226
	resina * diluição	0,034	0,011
	resina * tempo	<0,001	0,149
	diluição * tempo	0,01	0,032
	resina * diluição * tempo	<0,001	0,057

Analisando a tabela 26., e tendo em conta que o valor de significância aceite é de 0,05, verifica-se a existência de diferenças significativas em relação à média em todos os fatores testados.

Na coluna do Eta parcial quadrado podemos tirar conclusões sobre a intensidade do efeito provocado por um determinado fator. Assim, e tal como aconteceu no Ensaio III, foi o tempo o fator com o efeito mais forte e a resina o efeito menos forte.

De modo a ter uma melhor perceção do comportamento das resinas ProBase®, foram feitos dois gráficos (Gráfico 13. e Gráfico 14.), recorrendo aos valores médios de viabilidade celular dos extratos não diluídos em cada um dos tempos em estudo (30 minutos, 24 horas, 7 dias, 14 dias e 1 mês) e para cada um dos testes de quantificação da viabilidade celular (Cristal Violeta e MTT). Através da análise dos dois gráficos podemos verificar que a viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, quando expostos aos extratos não diluídos das resinas em estudo, foi inferior às 24h (teste do MTT) e aos 7 dias (teste do Cristal Violeta e teste do MTT) por parte da resina ProBase® Cold. Nos restantes tempos

em estudo, foi a resina acrílica ProBase® Hot que originou percentagens de viabilidade celulares mais baixas. Os 124,9% de viabilidade celular atingidos com a exposição ao extrato dos 30 minutos, no Teste do Cristal Violeta, podem ser explicados devido a uma falha do operador na pipetagem da diluição 1:1 (não diluído) pelos poços correspondentes.

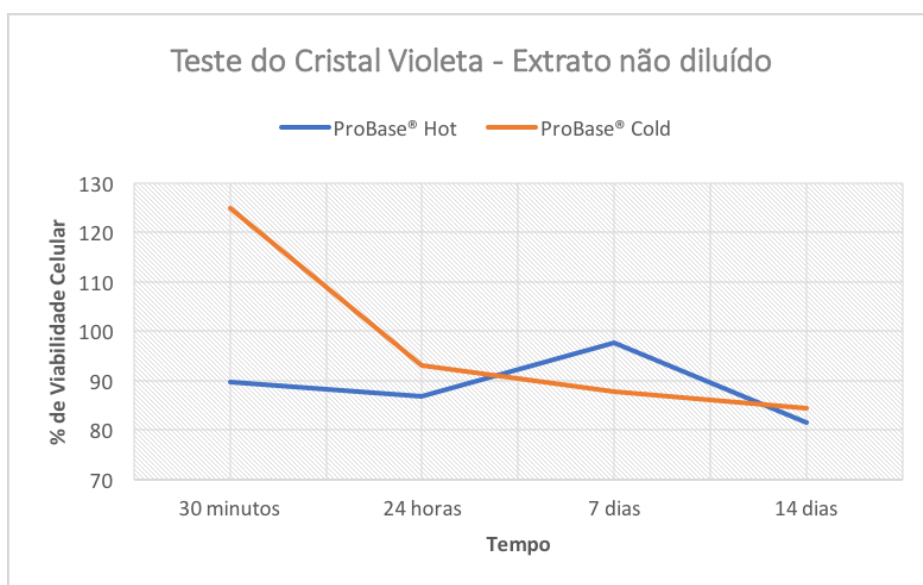


Gráfico 13. Viabilidade Celular dos fibroblastos 3T3 quando expostos aos extratos não diluídos das resinas ProBase® e recorrendo ao teste do Cristal Violeta.

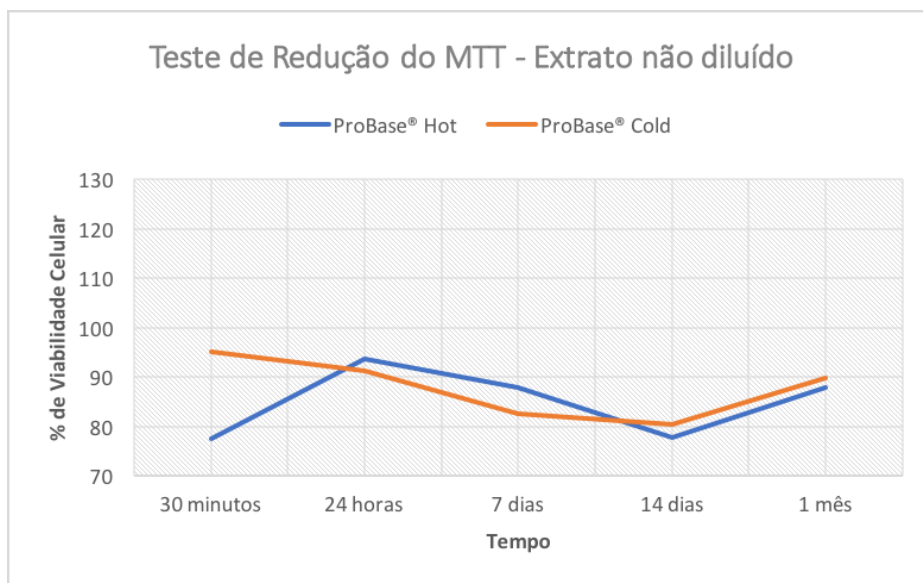


Gráfico 14. Viabilidade Celular dos fibroblastos 3T3 quando expostos aos extratos não diluídos das resinas ProBase® e recorrendo ao teste do MTT.

V. DISCUSSÃO

Este estudo pretendia avaliar se as resinas acrílicas da Ivoclar Vivadent AG, ProBase® Hot, resina acrílica de polimerização térmica (termopolimerizável) e ProBase® Cold, resina acrílica de polimerização química (autopolimerizável), usadas na confecção das bases de próteses removíveis desencadeiam efeitos citotóxicos. Dado que estes métodos de polimerização (autopolimerização e termopolimerização) das resinas acrílicas são utilizados regularmente na prática clínica, queremos saber se podemos considerar um melhor do que o outro (McCabe & Walls, 2008).

As bases protéticas estão em contacto com a mucosa oral por longos períodos de tempo e é sabido que estas vão libertando monómeros residuais, os quais têm sido responsabilizados pelas alterações das propriedades físicas e mecânicas das próteses removíveis e por causar respostas alérgicas na mucosa oral (Jorge, Giampaolo, Machado, & Vergani, 2003). Deste modo, torna-se importante verificar se os materiais em causa são citotóxicos.

As resinas acrílicas em estudo, ProBase® Hot e ProBase® Cold, foram manipuladas de acordo com as instruções do fabricante e foram feitos vários discos com 5mm de diâmetro e 2mm de altura. Quatro discos de cada resina foram colocados em 7mL de meio DMEM e incubados por 30 minutos, 24 horas, 7 dias, 14 dias e 1 mês. Assim, simulámos a libertação de monómeros residuais na cavidade oral desde o tempo que geralmente dura a consulta da entrega da prótese (30 minutos), passando pelas 24 horas, quando geralmente ocorrem as primeiras reações adversas, e pelas restantes semanas até à consulta de controlo, que pode ser realizada ao fim de 1 mês. Estes extratos foram colocados em contacto com fibroblastos de murganho NIH/3T3 (Sigma) e foram realizados testes de biocompatibilidade, metodologia usada por autores como Lai, Chen, Lee, Shieh, & Hung (2004).

Os testes de biocompatibilidade incluem os testes de citotoxicidade *in vitro* que, embora apresentem limitações (no caso deste estudo, por exemplo, não têm em conta as ações protetoras da saliva e das camadas de queratina e mucina presentes na mucosa oral) que impedem que se tirem conclusões definitivas sobre o que vai acontecer *in vivo*, são

uma ferramenta fundamental na previsão do comportamento biológico de determinados materiais (Jorge et al., 2003).

Uma vez que a ISO aconselha a utilização de mais do que um teste *in vitro* para o estudo da biocompatibilidade, nesta investigação foram aplicados dois testes: o teste de redução do MTT e o teste do Cristal Violeta, dois testes colorimétricos de referência para se poder quantificar a viabilidade celular após incubação das células com o material que se pretende testar (Ishiyama et al., 1996).

Após revisão da literatura, verificámos que existem diversos estudos que avaliam a citotoxicidade de várias resinas acrílicas. No entanto, existe uma lacuna no que diz respeito às resinas ProBase® que, apesar de muito utilizadas na prática clínica, não estão muito descritas na literatura quanto aos seus níveis de toxicidade celular.

Começámos este estudo pela determinação do número de células por poço adequado para cada um dos testes a realizar, que pode variar entre diferentes operadores e entre diferentes ensaios. Para o ensaio do Cristal Violeta o número de células escolhido foi 4×10^3 e para o ensaio do MTT foi 2×10^4 . Estes valores foram escolhidos de acordo com a Lei de Lambert-Beer, que estabelece uma relação entre a absorvância e o número de células, e tendo em conta o limite de deteção do aparelho de espectrofotometria, que se situa entre os valores 0,2 e 1 de absorvância.

Para a aplicação destes testes foi, também, importante escolher um controlo de morte celular, ou seja, um material com toxicidade conhecida nas condições experimentais utilizadas, de modo a validar os resultados obtidos. Foram também utilizados poços com células em meio não exposto, sendo que a absorvância média destes poços constituiu os 100% de viabilidade celular, valores imprescindíveis para o cálculo da viabilidade celular dos poços com células em contacto com extratos de resina acrílica.

Relativamente ao controlo de morte celular, foram testados os seguintes compostos: Metanol (2,5% e 5%), Etanol (1,75% e 3,5%), DMSO (2,5% e 5%) e Triton X-100 (2,45% e 4,9%) e foi possível concluir que, recorrendo ao DMSO a 5% ou ao Triton-X a 2,45% ou 4,9%, os resultados obtidos em termos de morte celular eram muito semelhantes. Assim, optou-se pelo DMSO a 5%, uma vez que o Triton X-100 apresenta uma viscosidade que torna complicada a sua pipetagem com exatidão.

Ao longo desta investigação, as células, nas concentrações acima descritas, foram sendo cultivadas nos 96 poços de cada uma das placas e postas em contacto com os extratos de cada uma das resinas em estudo. Todas as placas incluíram uma coluna de poços com células em meio não exposto, uma coluna de poços com células em contacto com o controlo de morte celular e os restantes poços com as diversas diluições dos extratos de resina em estudo. Tendo os dois extremos do espectro de viabilidade celular (um controlo de morte celular e um controlo de viabilidade celular), foi possível perceber, do ponto de vista experimental, se o ensaio decorria com sucesso.

Independentemente do ensaio, do tempo, da diluição e da resina em causa, a viabilidade celular nunca registou valores inferiores aos 70%. Assim, e de acordo com a norma ISO 10993-5:2009, podemos afirmar que nenhuma das resinas mostrou ter efeitos citotóxicos nos fibroblastos 3T3.

Apesar de nenhuma das resinas ter efeitos citotóxicos nas células utilizadas, o fator resina teve uma influência estatisticamente significativa na viabilidade celular, tal como se pode constatar pelas tabelas 15 e 26. Também o fator diluição e o fator tempo tiveram influência na alteração da viabilidade celular, tendo sido o tempo o fator a produzir alterações com maior intensidade (cerca de duas vezes superior ao fator diluição e quatro vezes superior ao fator resina, tanto no Ensaio III – Teste do Cristal Violeta, como no Ensaio IV – Teste do MTT).

Através do ensaio do Cristal Violeta apenas foram verificadas diferenças entre as duas resinas ao fim de 30 minutos, nas diluições 1:16 (p-value = 0,033) e 1:1 (p-value < 0,001), de acordo com o teste de Tukey HSD. No caso do ensaio do MTT, e também de acordo com o teste de Tukey HSD, foram registadas diferenças entre as duas resinas nas diluições 1:4, 1:2 e 1:1 (p-values < 0,001) aos 30 minutos e nas diluições 1:16, 1:8, 1:4 e 1:2 (p-values \leq 0,001) ao fim de 14 dias. Sempre que foram registadas diferenças estatisticamente significativas, a resina ProBase® Hot foi a responsável pelos valores mais baixos de viabilidade dos fibroblastos 3T3, tal como se pode verificar nos gráficos 4, 8 e 11. Em todas as outras diluições e tempos não foram registadas diferenças significativas entre as duas resinas em estudo.

Apesar destas diferenças registadas que, em termos estatísticos, foram significativas, é importante verificar que estas ocorreram quase sempre em diluições diferentes da 1:1 (não diluído). Assim, estas diferenças poderão estar associadas a erros

experimentais associados e tornam-se pouco significativas em termos clínicos e experimentais.

No que diz respeito a valores médios de viabilidade celular, através do teste do Cristal Violeta, a resina ProBase® Hot apresentou uma viabilidade celular média mais baixa do que a resina ProBase® Cold em praticamente todos os tempos testados, tendo sido superior apenas aos 14 dias. No entanto, através do teste de Redução do MTT, podemos verificar que, nas 24 horas e nos 7 dias, apresentou uma viabilidade celular média superior àquela apresentada pela resina autopolimerizável.

Ao contrário do que os resultados deste estudo apresentaram, vários trabalhos indicam que as resinas autopolimerizáveis são as que contêm maior quantidade de monómero residual e, portanto, as mais citotóxicas (Bayraktar, Guvener, Bural, & Uresin, 2006; Camacho et al., 2014; Goiato, Freitas, Santos, et al., 2015; Jorge et al., 2003; McCabe & Walls, 2008; Rashid et al., 2015). Nas condições testadas e com as resinas em estudo, verificou-se o contrário, embora as diferenças sejam ligeiras. Ou seja, a resina termopolimerizável foi a que induziu um maior decréscimo na viabilidade celular em termos gerais e foi a que apresentou sempre viabilidade celular mais baixa, nas condições em que foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre as duas resinas. No entanto, nenhuma das resinas originou valores de viabilidade celular abaixo dos 70%, limite definido pela norma ISO 10993-5:2009 para poderem ser consideradas como tóxicas.

Uma vez que foram verificadas diferenças pouco significativas entre as duas resinas em algumas das condições testadas, é de esperar que não tenha havido diferenças significativas na libertação de monómeros residuais. Estes resultados foram igualmente obtidos por Kalipçilar, Karaagaçlioglu, & Hasanreisoglu (1991), uma vez que estes usaram, do mesmo modo, uma resina acrílica de polimerização térmica e uma de polimerização química, no entanto, diferentes das resinas ProBase®, com vista a comparar a influência dos dois tipos de polimerização, e os seus resultados também indicaram que não havia diferenças significativas na quantidade de monómeros residuais de ambas as resinas.

Os menores valores de viabilidade celulares originados pela resina ProBase® Hot, podem ser explicados em parte pelo ciclo de polimerização utilizado. Neste estudo, a resina termopolimerizável foi polimerizada de acordo com o método recomendado pelo

fabricante, tendo a mufla sido colocada em água fria, a qual foi aquecida de seguida até aos 100°C e deixada a ferver por 45 minutos. No entanto, estando a água a 100°C, facilmente a temperatura dentro da mufla ultrapassa esse valor. Se a temperatura ultrapassar os 100.3°C (ponto de ebulição do monómero), vão ser originadas porosidades, as quais vão piorar as propriedades físicas e mecânicas das próteses, bem como facilitar a libertação de monómeros residuais (Yeung, Chow, & Clark, 1995).

De acordo com um estudo publicado por Kimpara et al. (2009) os ciclos de polimerização das resinas termicamente ativadas têm efeito na quantidade de monómeros residuais, tendo os autores concluído que o ciclo rápido (maior temperatura, durante um período de tempo mais curto) origina mais porosidades nas resinas acrílicas e maior quantidade de monómeros residuais. Também Jagger (1978), concluiu que uma temperatura mais baixa e constante, durante um período de tempo mais longo, é o mais indicado para evitar o aparecimento de porosidades no material e conseguir melhores propriedades físicas e mecânicas. No entanto, acrescenta também que, após o final desta polimerização, a temperatura pode ser aumentada de modo a reduzir a quantidade de monómeros residuais.

Kedjarune et al. (1999), após estudarem três resinas termopolimerizáveis e três resinas autopolimerizáveis, concluíram que o tipo e o ciclo de polimerização, bem como a quantidade de monómero na mistura inicial, influenciam a quantidade de monómeros residuais. Relativamente ao tempo de polimerização, estão de acordo com a ideia de que os ciclos rápidos originam maior concentração final de monómeros residuais.

Trubiani et al. (2012) compararam a viabilidade celular de três resinas acrílicas autopolimerizáveis, incluindo a ProBase® Cold, antes e após o polimento, tendo concluído que o polimento é um passo importante para a diminuição da libertação de monómeros residuais e, conseqüentemente, para a diminuição da probabilidade de ocorrerem possíveis reações adversas.

Um bom polimento mecânico, ao contrário do polimento químico, faz com que a quantidade de monómeros residuais presentes na resina acrílica seja mais baixa (Gonçalves, Menezes, & Silva, 2008). No nosso estudo, devido às reduzidas dimensões dos discos, foi dificultada a possibilidade de efetuar um correto polimento às amostras, motivo que poderá ter influenciado os valores de viabilidade celular obtidos.

Para além da utilização de ciclos com menor temperatura e por um período de tempo mais longo e do polimento que deve ser feito após a polimerização das resinas acrílicas, são vários os procedimentos que podem ser adotados com o objetivo de diminuir a quantidade final de monómeros residuais e, conseqüentemente, diminuir a probabilidade de ocorrência de reações adversas quando em contacto com os tecidos orais.

Lamb et al. (1983), verificaram que existem determinadas situações que podem baixar a quantidade de monómeros residuais das resinas autopolimerizáveis, nomeadamente, um aumento na proporção de pó-líquido, uma “pré-polimerização” a uma baixa temperatura, bem como uma polimerização final a temperaturas mais elevadas e excluindo o ar, uma vez que a difusão do oxigénio nas cadeias de polímeros leva a um aumento significativo da concentração de monómeros residuais.

Gautam et al. (2012) e Mallikarjuna (2014) também sugerem que as resinas autopolimerizáveis devem ser submetidas a uma polimerização adicional, com radiação micro-ondas, para que a quantidade de monómeros residuais seja diminuída.

Outro estudo, realizado por Vallittu et al. (1995), concluiu que o armazenamento de uma prótese durante 1 a 2 dias antes da sua entrega, em água aquecida a 37°C, reduz a quantidade de monómeros residuais e, conseqüentemente, o seu nível de citotoxicidade. Bayraktar et al. (2006) também quis perceber quais as variáveis que poderiam influenciar a quantidade de monómeros residuais, tendo chegado às mesmas conclusões em relação ao armazenamento em água a 37°C.

Embora este estudo mostre que as resinas ProBase® não são tóxicas, é importante continuar a realizar este tipo de estudos devido à preocupação sobre a libertação de monómeros residuais e conseqüentes efeitos. Os resultados destes estudos podem ajudar na descoberta de métodos que diminuam a quantidade de monómeros residuais libertados melhorando, conseqüentemente, a toxicidade dos materiais e diminuindo a probabilidade de ocorrerem reações adversas resultantes do uso desses mesmos materiais, tornando o uso das resinas acrílicas, deste modo, numa experiência mais agradável e confortável para os doentes.

Para melhor reproduzir o que acontece na cavidade oral, estes ensaios deverão ser realizados *in vivo*, sendo que esse será o próximo passo para poder afirmar com certeza a existência ou inexistência de citotoxicidade em determinado material.

VI. CONCLUSÃO

Após realização desta investigação *in vitro* podemos concluir que:

- Nas condições testadas, tanto a resina ProBase® Hot como a resina ProBase® Cold influenciaram a viabilidade celular. No entanto, de acordo com a norma ISO 10993-5:2009, nenhuma pode ser considerada citotóxica, uma vez que nenhuma chegou a atingir valores de viabilidade celular abaixo dos 70% definidos por esta norma.
- Quando comparamos as duas resinas acrílicas, ProBase® Hot e ProBase® Cold, constatamos que existiram algumas diferenças em determinadas diluições e tempos e que a resina ProBase® Hot foi a que originou níveis de viabilidade celular mais baixos, sugerindo que o método de polimerização tem influência. As diferenças registradas, embora tenham significado estatístico, são pouco significativas em termos experimentais e, consequentemente, em termos clínicos.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Rahman, H. K., Tahir, C. D., & Saleh, M. M. (2013). Incidence of partial edentulism and its relation with age and gender. *Zanco J. Med. Sci.*, 17(2), 463–470. <https://doi.org/10.15218/zjms.2013.0033>
- Academy of Prosthodontics (2017). Glossary of Prosthodontic Terms (9th Edition). J Prosthet Dent.
- Al-Johany, S. S., & Andres, C. (2008). ICK Classification System for Partially Edentulous Arches. *Journal of Prosthodontics*, 17, 502–507. <https://doi.org/10.1002/9781119115397.ch1>
- Ali, U., Karim, K. J. B. A., & Buang, N. A. (2015). A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). *Polymer Reviews*, 1–28. <https://doi.org/10.1080/15583724.2015.1031377>
- Anusavice, K. J., Shen, C., & Rawls, H. R. (2013). *Phillips Materiais Dentários* (12^a Edição). Elsevier Editora Ltda.
- Assaoka, S. K., Cesar, E. A., & Oliveira, F. de J. (2012). *Prótese Dentária: princípios fundamentais técnicas laboratoriais* (2^a Edição). Editora Napoleão Ltda.
- Ayaz, E. A., Durkan, R., Koroglu, A., & Bagis, B. (2014). Comparative effect of different polymerization techniques on residual monomer and hardness properties of PMMA-based denture resins. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 12(3), 228–233. <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000199>
- Bayraktar, G., Guvener, B., Bural, C., & Uresin, Y. (2006). Influence of polymerization method, curing process, and length of time of storage in water on the residual methyl methacrylate content in dental acrylic resins. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 76(2), 340–345. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30377>
- Bettencourt, A. F., Neves, C. B., Almeida, M. S., Pinheiro, L. M., Oliveira, S. A., Lopes, L. P., & Castro, M. F. (2010). Biodegradation of acrylic based resins: A review. *Dental Materials*, 26, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.01.006>

- Branco de Andrade, M. S. (2007). *Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultraestruturais de microcistinas em células Vero*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Camacho, D. P., Svidzinski, T. I. E., Furlaneto, M. C., Lopes, M. B., & Corrêa, G. de O. (2014). Based Polymethylmethacrylate. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, 6(3), 63–72.
- Carr, A. B., & Brown, D. T. (2011). *McCracken's Removable Partial Prosthodontics* (12th ed.).
- Chiba, K., Kawakami, K., & Tohyama, K. (1998). Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. *Toxicology in Vitro*, 12, 251–258. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(97\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(97)00107-0)
- Crissey, J. T. (1965). Stomatitis, Dermatitis, and Denture Materials. *Arch Derm*, 92, 45–48.
- Cruz, Á. S., Barbosa, M. L., & Pinto, T. de J. A. (2004). Testes in vitro como alternativa aos testes in vivo de Draize. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, 64(1), 1–9.
- Danesh, G., Hellak, T., Reinhardt, K., Végh, A., Schäfer, E., & Lippold, C. (2012). Elution characteristics of residual monomers in different light- and auto-curing resins. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64, 867–872. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.03.008>
- Dastagir, K., Reimers, K., Lazaridis, A., Jahn, S., Maurer, V., Strauß, S., ... Vogt, P. M. (2014). Murine Embryonic Fibroblast Cell Lines Differentiate into Three Mesenchymal Lineages to Different Extents: New Models to Investigate Differentiation Processes. *Cellular Reprogramming*, 16(4), 241–252. <https://doi.org/10.1089/cell.2014.0005>
- Durner, J., Wellner, P., Hickel, R., & Reichl, F. X. (2012). Synergistic interaction caused to human gingival fibroblasts from dental monomers. *Dental Materials*, 28, 818–823. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.031>
- Emami, E., Souza, R. F., Kabawat, M., & Feine, J. S. (2013). The Impact of Edentulism on Oral and General Health. *International Journal of Dentistry*, 2013, 1–7.

- <https://doi.org/10.1155/2013/498305>
- Emmler, J., Seiss, M., Kreppel, H., Reichl, F. X., Hickel, R., & Kehe, K. (2008). Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dental Materials*, 24, 1670–1675. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.04.001>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 343–346. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Fiori, S. R. (1993). *Atlas de Prótese Parcial Removível* (4ª Edição). Pancast Editora Com. E Repres. Ltda.
- Francis, J., Shetty, R., Shenoy, K., & Somaraj, V. (2016). Comparative evaluation on the influence of different curing cycles on the mechanical properties of three commercially available denture base resins: an in-vitro study. *Journal Of Applied Dental and Medical Sciences*, 2(3), 23–30. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/311886409_Comparative_Evaluation_on_the_Influence_of_Different_Curing_Cycles_on_the_Mechanical_Properties_of_Three_Commercially_Available_Denture_Base_Resins_An_In-Vitro_Study
- Galagali, G., & Mahoorkar, S. (2010). Critical Evaluation of Classification Systems of Partially Edentulous Arches. *International Journal of Dental Clinics*, 2(3), 45–52. Retrieved from http://intjdc.org/index.php/intjdc/article/viewFile/2.3.8/pdf_1
- Gautam, R., Singh, R. D., Sharma, V. P., Siddhartha, R., Chand, P., & Kumar, R. (2012). Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 9999B(00). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32673>
- Goiato, M. C., Freitas, E., Dos Santos, D., De Medeiros, R., & Sonogo, M. (2015). Acrylic resin cytotoxicity for denture base - Literature review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24(4), 679–686. <https://doi.org/10.17219/acem/33009>
- Gonçalves, T. S., Menezes, L. M., & Silva, L. E. A. (2008). Residual Monomer of Autopolymerized Acrylic Resin According to Different Manipulation and Polishing Methods. *Angle Orthodontist*, 78(4), 722–727. <https://doi.org/10.2319/060407-265.1>

- Huebsch, N., & Mooney, D. J. (2009). Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*, 462(7272), 426–432. <https://doi.org/doi:10.1038/nature08601>
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., & Ueno, K. (1996). A Combined Assay of Cell Viability and in Vitro Cytotoxicity with a Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet. *Biol. Pharm. Bull.*, 19(11), 1518–1520. <https://doi.org/10.1248/bpb.19.1518>
- ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (2009). Suíça. Disponível em www.iso.org
- ISO 20795-1:2013. Dentistry - Base Polymers - Part 1: Denture Base Polymers (2013). Suíça. Disponível em www.iso.org
- Jagger, R. G. (1978). Effect of the curing cycle on some properties of a polymethylmethacrylate denture base material. *Journal of Oral Rehabilitation*, 5, 151–157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1978.tb01208.x>
- Jeyapalan, V., & Krishnan, C. S. (2015). Partial Edentulism and its Correlation to Age, Gender, Socio-economic Status and Incidence of Various Kennedy's Classes– A Literature Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(6), 14–17. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13776.6124>
- Jorge, J. H., Giampaolo, E. T., Machado, A. L., & Vergani, C. E. (2003). Cytotoxicity of denture base acrylic resins: A literature review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 90(2), 190–193.
- Kalipçılar, B., Karaagaçlıoğlu, L., & Hasanreisoglu, U. (1991). Evaluation of the level of residual monomer in acrylic denture base materials having different polymerization properties. *Journal of Oral Rehabilitation*, 18, 399–401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1991.tb01684.x>
- Kedjarune, U., Charoenworakul, N., & Koontongkaew, S. (1999). Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: Cytotoxicity testing related to residual monomer. *Australian Dental Journal*, 44(1), 25–30. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1999.tb00532.x>
- Kimpara, E. T., Silva, L. H., Costa, C. B., Borges, A. L. S., Tango, R. N., & Junior, T. J. de A. P. (2009). Resinas acrílicas para prótese total: efeito de ciclos de

- polimerização sobre a quantidade de monômero residual e porosidades. *Revista Da Faculdade de Odontologia*, 14(1), 37–41.
- Koutis, D., & Freeman, S. (2001). Allergic contact stomatitis caused by acrylic monomer in a denture. *Australasian Journal of Dermatology*, 42, 203–206. <https://doi.org/10.1046/j.1440-0960.2001.00517.x>
- Lai, Y. L., Chen, Y. T., Lee, S. Y., Shieh, T. M., & Hung, S. L. (2004). Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation*, 31, 1165–1172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2004.01355.x>
- Lamb, D. J., Ellis, B., & Priestley, D. (1983). The effects of process variables on levels of residual monomer in autopolymerizing dental acrylic resin. *Journal of Dentistry*, 11(1), 80–88. [https://doi.org/10.1016/0300-5712\(83\)90051-9](https://doi.org/10.1016/0300-5712(83)90051-9)
- Langdon, S. P. (2004). *Cancer Cell Culture - Methods and Protocols*. Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1385/1592594069>
- Mallikarjuna, A. V. (2014). Cytotoxicity of Acrylic Resin: A Review Arunasree V Mallikarjuna. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 13(3), 7–9.
- Marquezzini, A. D., & Bombonatti, P. E. (1986). Adaptação de bases de dentaduras em função de marcas de resinas acrílicas, diferentes ciclos de polimerização e absorção de água. *Rev. Odont. UNESP*, 15/16, 147–153.
- McCabe, J. F., & Walls, A. W. G. (2008). *Applied Dental Materials* (9th ed.). Blackwell Publishing Ltd.
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Neunzehn, J., Lüttenberg, B., & Wiesmann, H.-P. (2012). Investigation of biomaterials by human epithelial gingiva cells: An in vitro study. *Head and Face Medicine*, 8:35, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1746-160X-8-35>
- OMD. (2017). Barômetro da Saúde Oral da OMD de 2017. Retirado de www.ond.pt em Fevereiro, 2018

Powers J. M., Wataha J. C. (2008) *Dental Materials: Properties and Manipulation* (9th Edition). Elsevier Mosby.

Rashid, H., Sheikh, Z., & Vohra, F. (2015). Allergic effects of the residual monomer used in denture base acrylic resins. *European Journal of Dentistry*, 9(4), 614–619. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.172621>

Trubiani, O., Toniato, E., DI Iorio, D., Diomede, F., Merciaro, I., D’Arcangelo, C., & Caputi, S. (2012). Morphological Analysis and Interleukin Release in Human Gingival Fibroblasts Seeded on Different Denture Base Acrylic Resins. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 25(3), 637–639.

Vallittu, P. K., Miettinen, V., & Alakuijala, P. (1995). Residual monomer content and its release into water from denture base materials. *Dental Materials*, 11, 338–342. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(95\)80031-X](https://doi.org/10.1016/0109-5641(95)80031-X)

Van Joost, T., Van Ulsen, J., & Van Loon, L. A. J. (1988). Contact allergy to denture materials in the burning mouth syndrome. *Contact Dermatitis*, 18, 97–99.

Volpato, C. Â. M., Garbelotto, L. G. D., Zani, I. M., & Vasconcellos, D. K. (2012). *Próteses Odontológicas: uma visão contemporânea – fundamentos e procedimentos*. Livraria Santos Editora Ltda.

Yeung, K. C., Chow, T. W., & Clark, R. K. F. (1995). Temperature and dimensional changes in the two-stage processing technique for complete dentures. *Journal of Dentistry*, 23(4), 245–253. [https://doi.org/10.1016/0300-5712\(95\)91190-X](https://doi.org/10.1016/0300-5712(95)91190-X)